



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EFFECTO DE LA ATRAZINA EN CONDUCTAS ASOCIADAS A SISTEMAS
DOPAMINÉRGICOS DE RATAS HEMBRA.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
(NEUROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA:
JONATHAN JOSUÉ SÁNCHEZ YÉPEZ**

**TUTOR PRINCIPAL:
DRA. VERÓNICA MIREYA RODRÍGUEZ CÓRDOVA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:
DRA. REBECA CORONA GARCÍA-CABRAL
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM**

**DR. JORGE HUMBERTO LIMÓN PACHECO
ESCUELA MILITAR DE MEDICINA, SECRETARIA DE LA DEFENSA
NACIONAL**

QUERÉTARO, SEPTIEMBRE, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A mi tutora, la Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova, por brindarme su confianza desde el primero momento en que llegue a su laboratorio, por compartirme parte de su vasto conocimiento y por la paciencia y el tiempo que dedicó a resolver mis dudas.

A la bióloga, María Soledad Mendoza Trejo por las enseñanzas que me brindó y su tiempo, paciencia y ayuda técnica en la realización de los experimentos a lo largo de todo el proyecto.

A la Dra. Magdalena Giordano por su amabilidad y atención cuando lo necesité.

A mi comité tutor, la Dra. Rebeca Corona García-Cabral y al Dr. Jorge Humberto Limón Pacheco quienes fueron parte importante de este proyecto y que con sus sabios y acertados comentarios siempre me motivaron a seguir adelante.

A Triana, mi compañera de laboratorio y ahora gran amiga, por su apoyo en la realización de los experimentos.

A la Dra. Alejandra Castilla León por su ayuda técnica en el muestreo del ciclo estral y al M.V.Z. José Martín García Servín ambos adscritos al bioterio del Instituto de Neurobiología.

A la Dra. Deisy Gasca Martínez por el apoyo en la realización de experimentos conductuales.

A la Dra. Nuri Aranda López de la Unidad de Enseñanza y a la Dra. Maricela Luna Muñoz coordinadora de la maestría en ciencias (neurobiología) por su asesoramiento y apoyo en los trámites académicos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Neurobiología por haberme otorgado el acceso a la infraestructura material e intelectual necesarias para la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (N. de registro 1085489) para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias (Neurobiología).

Al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (clave del proyecto IN212522) y al CONACYT (clave del proyecto 251510) por el apoyo de investigación otorgado a la Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova

A mi familia, mi apoyo incondicional.

A Miriam, mi inspiración.

Resumen

Estudios recientes muestran que la exposición crónica al herbicida atrazina (ATR) provoca alteraciones en la actividad locomotora y el sistema dopaminérgico de ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, sin embargo, existe evidencia que sugiere un efecto sexo-dependiente de la ATR en diferentes modelos animales por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar si la exposición crónica a la ATR provoca hiperactividad en ratas hembra. Se utilizaron ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley divididas al azar en tres grupos. Dos grupos fueron expuestos diariamente a 1 ó 10 mg de ATR/kg de peso corporal en el alimento mientras que el grupo control recibió alimento sin ATR durante 14 meses. Se evaluó la actividad locomotora espontánea mensualmente durante 12 meses y entre los 13 y 14 meses de exposición se evaluó la ansiedad, la memoria egocéntrica y espacial, la habituación/discriminación olfativa y la coordinación motora de los sujetos, así como los niveles de monoaminas en las estructuras cerebrales que integran los sistemas dopaminérgicos. Se observó que tanto el grupo expuesto a 1 ó 10 mg ATR presentaron hipoactividad vertical comparados con el grupo control solo después del primer mes de exposición, así como alteraciones en el proceso de habituación y discriminación olfativa de olores no sociales y sociales a los 14 meses. No se observaron alteraciones en la ansiedad, en la memoria espacial y egocéntrica, en la coordinación motora y en las concentraciones de dopamina y sus metabolitos en ninguna region cerebral de los sujetos de los diferentes grupos experimentales. Estos resultados sugieren que las hembras presentan afecciones en la capacidad olfativa después de una exposición crónica a ATR pero una mayor sensibilidad a los efectos neurotóxicos de la ATR en la actividad locomotora espontánea solo en etapas tempranas del desarrollo ya que estudios previos de nuestro grupo han mostrado que la exposición crónica a 10 mg ATR durante 10 a 12 meses resultó en hiperactividad, mayores índices de ansiedad y deficiencias en la coordinación motora en ratas macho y estos resultados se correlacionan con un decremento en la concentración de dopamina estriatal.

Abstract

Recent studies show that chronic exposure to the herbicide atrazine (ATR) causes alterations in locomotor activity and the dopaminergic system of male rats of the Sprague-Dawley strain, however, there is evidence suggesting a sex-dependent effect of atrazine in different animal models, so the objective of this study was to evaluate whether chronic exposure to ATR causes hyperactivity in female rats. Female rats of the Sprague-Dawley strain randomly divided into three groups were used. Two groups were exposed daily to 1 or 10 mg ATR/kg body weight in food while the control group received food without ATR for 14 months. Spontaneous locomotor activity was evaluated monthly for 12 months while anxiety, egocentric, spatial memory, olfactory habituation/discrimination and motor coordination were evaluated between 13 and 14 months of ATR exposure, as well as the levels of monoamines in the brain structures that integrate the dopaminergic systems. It was observed that both the group exposed to 1 or 10 mg ATR presented vertical hypoactivity compared to the control group only after the first month of exposure, as well as alterations in the habituation process and olfactory discrimination of non-social and social odors at 14 months. No alterations were observed in anxiety, in spatial and egocentric memory, in motor coordination and in the levels of dopamine and its metabolites in any brain region of the subjects of the different experimental groups. These results suggest that females show impaired olfactory capacity after chronic exposure to ATR but greater sensitivity to the neurotoxic effects of ATR on spontaneous locomotor activity only in early stages of development as previous studies by our group have shown that chronic exposure to 10 mg ATR for 10 to 12 months resulted in hyperactivity, higher rates of anxiety, and impaired motor coordination in male rats, and these results correlate with decreased striatal dopamine levels.

Abreviaturas

6-OHDA	1-metil-4-fenilpiridinio y la 6-hidroxidopamina
AChE	Acetilcolinesterasa
ATR	Atrazina
AV	Apertura vaginal
AVT	Área ventral tegmental
BLA	Amígdala basolateral
BO	Bulbo olfatorio
CB	Calbindina D28K
CEE	Células empenachadas externas
CGL	Capa glomerular
CGr	Capa granular
CGs	Células granulares
CM	Capa mitral
CNO	Capa del nervio olfatorio
CPE	Capa plexiforme externa
CPF	Corteza prefrontal
CPGs	Células periglomerulares
CPI	Capa plexiforme interna
CSAC	Células superficiales de axón corto
CYP	Citocromo P450
DA	Dopamina
DACT	Didealquil-atrazina
DAT	Transportador de dopamina
DE	Desetil-atrazina
DIP	Desisopropil-atrazina
DMT	Dimetoato
dop1r1	Receptor 1 a dopamina similar al tipo 1
dop1r2	Receptor 2 a dopamina similar al tipo 1
dop2r	Receptor a dopamina similar al tipo 2
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
dopecr	Receptor de dopamina/ecdisteroide
DPN	Día postnatal
EEM	Error estándar de la media
EP	Enfermedad de Parkinson
FAO	Organización de Alimentos y Agricultura
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
GPm	Globo pálido medial
GST	Glutación transferasa
HVA	Ácido homovanílico

IL-1b	Interleucina 1-b
LH	Hormona luteinizante
LTP	Potenciación a largo plazo
MAO	Monoamina oxidasa
MSN	Neuronas medianas espinosas
NAc	Núcleo accumbens
NSO	Neuronas sensoriales olfativas
NST	Núcleo subtalámico
PGs	Células yuxtglomerulares
Rpm	Revoluciones por minuto
SN	Substancia nigra
SNC	Sistema nervioso central
SNpc	Substancia nigra pars compacta
SNpr	Substancia nigra pars reticulata
STR	Estriado
TH	Tirosina hidroxilasa

Índice

Agradecimientos	ii
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Abreviaturas	vi
I. Introducción	1
II. Antecedentes	2
2.1 Atrazina	2
2.1.1 Biotransformación y metabolismo.....	3
2.1.2 Exposición	4
2.1.3 Efectos de la ATR en humanos.....	5
2.2 Sistemas dopaminérgicos.....	6
2.2.1 Estriado	7
2.2.2 Núcleo accumbens.....	8
2.2.3 Substancia nigra	9
2.2.4 Área ventral tegmental.....	9
2.2.5 Bulbo olfatorio	10
2.2.6 Dopamina.....	13
2.3 Efectos de la atrazina en sistemas dopaminérgicos	14
2.3.1 Efectos neuroquímicos de la ATR en roedores	14
2.3.2 Efectos de la ATR en la morfología cerebral en roedores	15
2.3.3 Efectos conductuales de la ATR en roedores.....	16
2.4 Diferencias experimentales entre machos y hembras	16
2.4.1 Efectos tóxicos dependientes del sexo por la exposición a pesticidas.....	19
2.4.2 Efectos tóxicos dependientes del sexo por la exposición a ATR.....	19
2.4.3 Diferencias dependientes del sexo en el sistema dopaminérgico de roedores..	20

III. Justificación	21
IV. Hipótesis	22
V. Objetivos	22
VI. Método	22
6.1 Sujetos	23
6.2 Preparación de croquetas con atrazina	23
6.3 Tareas conductuales	24
6.3.1 Evaluación neurológica	24
6.3.2 Actividad locomotora	26
6.3.3 Laberinto en cruz elevado	28
6.3.4 Tarea de laberinto en T	28
6.3.5 Laberinto radial de 8 brazos	30
6.3.6 Barra de equilibrio	32
6.3.7 Rodillo giratorio	33
6.3.8 Habitación/discriminación olfativa	33
6.4 Determinación de monoaminas	34
6.5 Análisis estadístico	35
VII. Resultados	36
7.1 Efecto de la ATR en la capacidad sensorial y motora	36
7.2 Efecto de la ATR en la actividad locomotora	36
7.2.1 Efecto de la ATR en la exploración.	37
7.2.2 Efecto de la ATR en la actividad locomotora espontánea general	39
7.2.3 Efecto de la ATR en el número de movimientos.	39
7.2.4 Efecto de la ATR en la actividad vertical	40
7.2.5 Efecto de la ATR en las estereotipias	41
7.2.6 Efecto de la ATR en el descanso	42

7.3 Efecto de la ATR en la ansiedad	45
7.3.1 Laberinto elevado en cruz.....	45
7.4 Efecto de la ATR sobre tareas de aprendizaje y memoria	45
7.4.1 Laberinto en T alternancia espontánea.....	45
7.4.2 Laberinto en T alternancia forzada	47
7.4.3 Laberinto radial gana y cambia	47
7.4.4 Laberinto radial gana y cambia con retardo	48
7.5 Efecto de la ATR en la coordinación motora	49
7.5.1 Barra de equilibrio	49
7.5.2 Cilindro giratorio.....	49
7.6 Efecto de la ATR en la habituación/discriminación olfativa	50
7.7 Efecto de la ATR en los niveles de monoaminas	55
VIII. Discusión	57
8.1 Actividad locomotora espontánea	57
8.2 Laberinto elevado en cruz.....	59
8.3 Laberinto en T (alternancia espontánea).....	61
8.4 Laberinto en T (alternancia forzada).....	62
8.6 Laberinto radial (gana y cambia con retardo).....	65
8.7 Coordinación motora fina.....	66
8.8 Coordinación motora gruesa.....	67
8.9 Habituación/discriminación olfativa.....	68
8.10 Concentraciones cerebrales de monoaminas	70
8.11 La importancia de estudiar ambos sexos.....	72
IX. Conclusiones	73
X. Perspectivas	73
XI. Referencias	74

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura química de la ATR.....	3
Figura 2. Metabolismo de la ATR	4
Figura 3. Sistema dopaminérgico.....	7
Figura 4. Vía esquemática de las principales conexiones neuronales en el BO	12
Figura 5. Síntesis de dopamina.....	14
Figura 6. Caja de actividad locomotora espontánea	26
Figura 7. Laberinto elevado en cruz	28
Figura 8. Alternancia espontánea	29
Figura 9. Alternancia forzada	30
Figura 10. Gana y cambia	31
Figura 11. Gana y cambia con retardo	32
Figura 12. Barra de equilibrio.....	33
Figura 13. Diseño experimental	35
Figura 14. Evaluación neurológica	36
Figura 15. Actividad horizontal	37
Figura 16. Actividad en el centro y el margen	38
Figura 17. Actividad vertical.....	39
Figura 18. Efecto de la ATR en el número de movimientos.....	40
Figura 19. Efecto de la ATR en la actividad vertical.....	41
Figura 20. Efecto de la ATR en la actividad estereotípica	42
Figura 21. Efecto de la ATR en el descanso	43
Figura 22. Efecto de la ATR en la ansiedad	45
Figura 23. Efecto de la ATR en la alternancia espontánea	46
Figura 24. Efecto de la ATR en la alternancia espontánea	46
Figura 25. Efecto de la ATR en la alternancia espontánea	47
Figura 26. Efecto de la ATR en el aprendizaje y memoria espacial	48
Figura 27. Efecto de la ATR en el aprendizaje y memoria espacial	49
Figura 28. Efecto de la ATR en la coordinación motora	50

Figura 29. Efecto de la ATR en la habituación olfativa	51
Figura 30. Efecto de la ATR en la discriminación olfativa	53
Figura 31. Efecto de la ATR en el tiempo de olfacción total.....	54
Figura 32. Efecto de la ATR en el tiempo de olfacción de los olores no sociales y sociales	54
Figura 33. Niveles de estradiol en sangre	56

Índice de Tablas

Tabla 1. Actividad locomotora	44
Tabla 2. Barra de equilibrio	49
Tabla 3. Ciclo estral.....	55
Tabla 4. Concentración de dopamina y sus metabolitos.....	57

I. Introducción

Según la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO; por sus siglas en inglés) (2017), el término plaguicida se refiere a materiales destinados a matar o controlar plagas (insecticidas, fungicidas, herbicidas, entre otros), así como aquellos materiales que controlan el comportamiento o la fisiología de las plagas (repelentes de insectos, hormonas de crecimiento de insectos) o de los cultivos, durante la producción o el almacenamiento, por lo que desempeñan un papel fundamental en la reducción de enfermedades y el aumento del rendimiento de los cultivos en todo el mundo.

Sin embargo, desde la década de 1940 en adelante, la producción mundial de plaguicidas ha aumentado a un ritmo de alrededor del 11% anual, pasando de 0,2 millones de toneladas en la década de 1950 a más de 5 millones de toneladas en el año 2000 (Carvalho, 2017). Actualmente se estima que tres mil millones de kilogramos de plaguicidas se usan en todo el mundo cada año, de los cuales solo el 1% se usa de manera efectiva en las plantas objetivo (Hayes *et al.*, 2017; Tudi *et al.*, 2021), mientras que las grandes cantidades restantes tienen el potencial de contactar con otros organismos y matrices (aire, suelo y agua) y como consecuencia, han contaminado el medio ambiente y causado impactos negativos en la salud (Miller, 2004).

Se han descrito efectos genotóxicos y neurotóxicos producto de la exposición a plaguicidas en diferentes organismos (Sanborn *et al.*, 2007), además de un posible vínculo con problemas en la fertilidad y reproducción y el padecimiento de ciertos tipos de cáncer (Bassil *et al.*, 2007).

En humanos, la exposición a los plaguicidas puede ocurrir a través de diferentes rutas que incluyen la exposición ambiental, la exposición ocupacional (producción, transporte, entrega y aplicación de plaguicidas) y a través de los alimentos. Existe una gran evidencia sobre el papel de los plaguicidas en el padecimiento de diferentes enfermedades humanas como el cáncer, esclerosis lateral amiotrófica, asma, bronquitis e infertilidad (Mostafalou y Abdollahi, 2017).

Diversos estudios han reportado que la exposición a herbicidas (como la atrazina) a través de la agricultura como ocupación y el consumo de agua potable contaminada se asocia con un mayor riesgo de desarrollar trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson (EP) que afecta tanto a la función motora como la cognitiva (Ascherio y Schwarzschild, 2016; Elbaz *et al.*, 2009).

Los pacientes con la EP se caracterizan por presentar bradicinesia (pobreza de movimiento) con rigidez, temblor en reposo o ambos, causados por la falta del neurotransmisor dopamina (DA) en el estriado debido a la pérdida progresiva de las células de proyección dopaminérgicas de la sustancia nigra (Nandipati y Litvan, 2016).

II. Antecedentes

2.1 Atrazina

La atrazina (ATR; 6-cloro-N-etil-N-isopropil-1, 3, 5-triazina-2, 4-diamina) es un herbicida utilizado en cultivos de maíz, caña y sorgo ya que provoca la muerte selectiva de una gran variedad de malezas y gramíneas al inhibir la fotosíntesis interrumpiendo la cadena de transporte de electrones en el cloroplasto (Good, 1961; Hansen *et al.*, 2013). La ATR pertenece a la familia de las cloro-triazinas con fórmula molecular de $C_8H_{14}ClN_5$ (Figura 1), tiene un peso molecular de 215.68 g/mol, una densidad específica de 1.23 g/cm³ a 22°C, una solubilidad en agua de 34.7 mg/L a 26°C y normalmente es estable en un medio neutro (pH de 6.0 – 8.0 a 24°C) (WHO, 2003). Su vida media en condición neutra es de aproximadamente 200 días, pero varía de 4 a 57 semanas dependiendo de varios factores ambientales como el pH, el contenido de humedad, la temperatura y la actividad microbiana (Márquez-Ramos *et al.*, 2017).

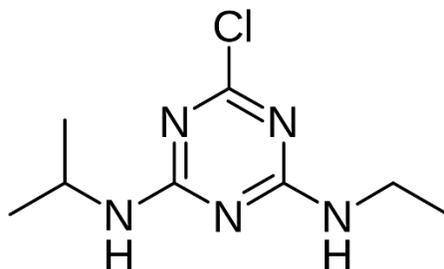


Figura 1. Estructura química de la ATR. 2-cloro-4-(etilamina)-6-(isopropilamina)-1,3,5-triazina.

2.1.1 Biotransformación y metabolismo

En cuanto a su biotransformación, se ha descrito que la ATR es metabolizada principalmente en el hígado por el citocromo P450 (CYP) y, en menor grado, por la enzima glutatión transferasa (GST). Los principales metabolitos producto de la acción del CYP son la desetil-atrazina (DE) y la desisopropil-atrazina (DIP) que, a su vez, pueden desalquilarse adicionalmente para generar la didealquil-atrazina (DACT), que es el principal metabolito detectado en el plasma de ratas (Brzezicki *et al.*, 2003), en plasma, orina y cerebro de ratones (Ross y Filipov, 2006) y en orina de humanos (Barr *et al.*, 2007). Por otro lado, el metabolismo de la ATR por la vía de las GST da lugar a la ATR-glutatión y posteriormente a la ATR-mercaptopurato que pueden ser eliminadas fácilmente por la bilis y la orina respectivamente (Figura 2) (Orr, 1987; Ross *et al.*, 2009).

En ratas Sprague-Dawley se ha reportado que después de dosis orales únicas de 1 ó 100 mg/kg de peso de ATR marcada con ^{14}C , aproximadamente el 74% de la dosis total se excretó en la orina y el 19% en las heces en un lapso de 7 días independientemente del sexo y dosis, lo cual indica una absorción oral completa de la ATR (Orr, 1987).

En ratones, al medir las concentraciones de ATR y sus metabolitos en la orina 24 hrs después de una única administración de 250 mg de ATR/kg de peso se observó que el metabolito más abundante fue el DACT que alcanzó una concentración máxima de 5400 μM , mientras que el segundo más abundante fue el DE con concentraciones de 80 μM , por otro lado, tanto las concentraciones de DIP y ATR

fueron de 28 μM y el metabolito de menor presencia fue la ATR-mercapturato que alcanzó solo 6 μM (Ross *et al.*, 2009).

Cabe mencionar que la ATR puede cruzar la barrera hematoencefálica y penetrar al cerebro a través de mecanismos desconocidos y que, al igual que lo reportado en la orina, el DACT es el metabolito más abundante con concentraciones de 50 μM tan solo 2 hrs después de la administración de 250 mg de ATR/kg de peso y que dichas concentraciones pueden persistir hasta 24 hrs después, mientras que la ATR alcanza concentraciones de solo 1-1.5 μM que decaen 12 horas después (Ross *et al.*, 2009).

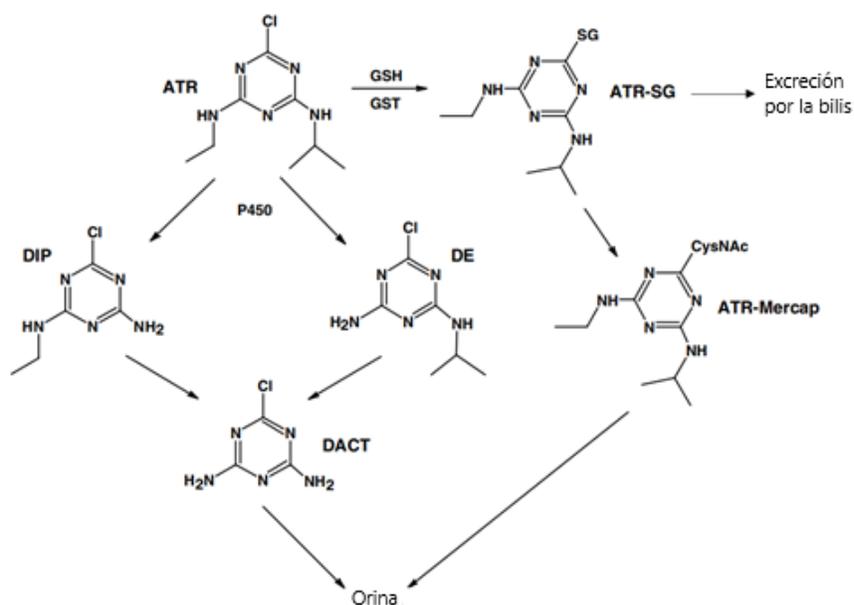


Figura 2. Metabolismo de la ATR. Esquema que muestra las diferentes vías y enzimas implicadas en la biotransformación de la ATR en el hígado. DE, desetil-atrazina; DIP, desisopropil-atrazina; DACT, didealquil-atrazina; ATR-SG, atrastina-glutation; ATR-Mercap, atrastina-mercapturato. Modificado de Ross y Filipov, 2006.

2.1.2 Exposición

Mundialmente, la ATR se introdujo al ámbito comercial en 1958 y desde entonces ha sido ampliamente utilizada como herbicida pre y post-emergente, sin embargo,

debido a su aplicación generalizada actualmente se le considera un contaminante ambiental.

Se ha reportado la presencia de ATR en aguas subterráneas y superficiales de Estados Unidos (Gilliom *et al.*, 2006), Italia (Meffe y de Bustamante, 2014) y España (Garrido *et al.*, 2000), así como en el agua de lluvia (Goolsby *et al.*, 1997) y en la niebla, aire, hielo ártico y agua de mar (Glotfelty *et al.*, 1987; Chernyak *et al.*, 1996), lo cual sugiere que este herbicida (así como muchos otros) puede ser transportado y depositado por factores climáticos hasta zonas distantes de su aplicación representando un peligro para la salud.

2.1.3 Efectos de la ATR en humanos

En humanos, la exposición a ATR puede darse en el ámbito laboral por vía inhalatoria o dérmica y puede producir reacciones de irritación, así como alteraciones en las funciones de algunos órganos, problemas de reproducción, y alteraciones hormonales (ATSDR, 2003). Por otro lado, se ha demostrado que en muestras de orina de mujeres embarazadas que consumieron agua contaminada con ATR se encontraron concentraciones cuantificables de ATR ($>1 \mu\text{g ATR/L}$) y esto se relacionó con una disminución del crecimiento fetal y el tamaño de la circunferencia de la cabeza del bebé (Chevrier *et al.*, 2011), así como con un aumento en la incidencia de partos prematuros (Ochoa-Acuña *et al.*, 2009).

Por otro lado, la relación de la exposición a la ATR con el padecimiento de otras enfermedades graves como el cáncer sigue siendo incierto debido a los resultados contrastantes presentados por diferentes grupos de investigación. Por ejemplo, Van Leeuwen *et al.* (1999) reportaron una tasa más alta de cáncer de estómago en áreas con altos niveles de contaminación por ATR en el agua, sin embargo, en una revisión más reciente Boffetta *et al.* (2013) no encontraron evidencia contundente de una asociación causal entre la exposición a ATR y el cáncer en general, ni para ningún tipo de cáncer específico.

A pesar de que se ha demostrado que la exposición a la ATR es muy común, aun no hay estudios donde se hayan evaluado los efectos de la exposición a ATR en el

sistema nervioso central (SNC) de humanos, sin embargo, estudios recientes que utilizan métodos conductuales y bioquímicos han sugerido que la ATR puede alterar el funcionamiento del sistema dopaminérgico en el cerebro de roedores (Bardullas *et al.*, 2011, 2013; Coban y Filipov, 2007; Rodríguez *et al.*, 2013, 2017; Song *et al.*, 2015)

2.2 Sistemas dopaminérgicos

De manera general, los sistemas dopaminérgicos están constituidos por una serie de núcleos subcorticales que modulan una gama de funciones distintas como la actividad locomotora y el procesamiento afectivo.

El control de acciones motoras finas está regulado a través de la vía nigroestriatal que se origina en las células dopaminérgicas en la zona compacta de la sustancia nigra (SNpc) y que mandan sus proyecciones al estriado dorsal y por otro lado, las funciones motivacionales como el reforzamiento y el procesamiento de la recompensa se regulan a través del sistema mesolímbico y mesocortical que se originan de las células dopaminérgicas del área ventral tegmental (AVT) y proyectan al núcleo accumbens (NAc) y la corteza prefrontal (CPF), respectivamente (Figura 3) (Centonze *et al.*, 2001; Goodman y Packard, 2017; Wise, 2004).

La desregulación de estas vías se ha relacionado con trastornos neurológicos y psiquiátricos como la EP, adicción, esquizofrenia, trastorno obsesivo compulsivo y síndrome de Tourette (Tritsch y Sabatini, 2012).

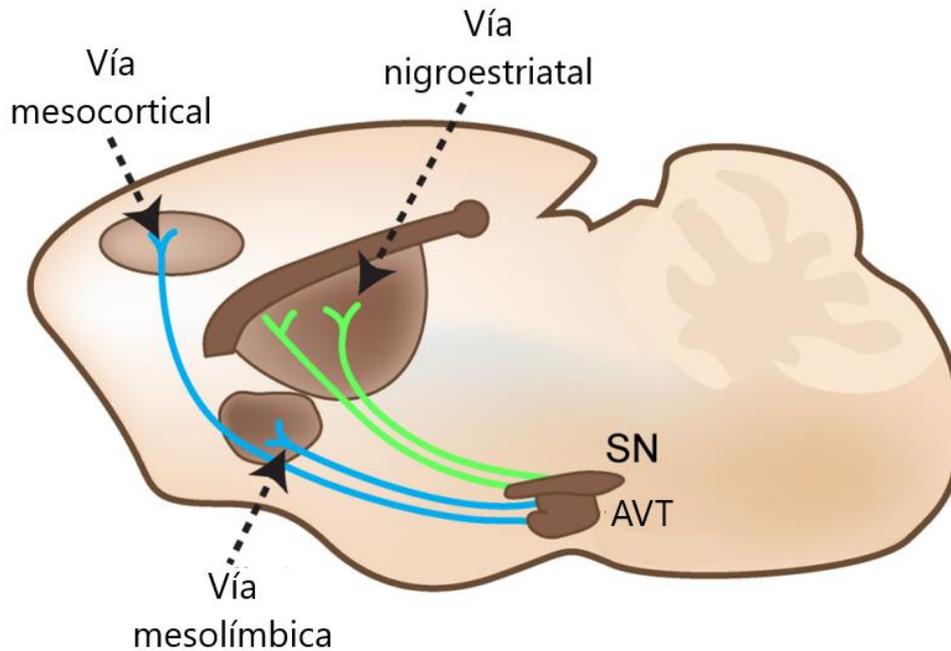


Figura 3. Sistema dopaminérgico. Esquema que representa el origen y proyecciones de la vía mesolímbica y mesocortical representadas en azul y de la vía nigroestriatal representada en verde en una sección sagital del cerebro de roedor. SN: sustancia nigra; AVT: área ventral tegmental. Modificado de Money y Stanwood (2013).

2.2.1 Estriado

Anatómicamente el estriado (STR) está conformado por neuronas medianas espinosas (MSN, por sus siglas en inglés) que representan más del 95% de las neuronas estriatales y son la principal vía de entrada y salida de información a los ganglios basales (Voorn *et al.*, 2004). Las neuronas estriatales restantes corresponden a varios tipos de interneuronas que no presentan axones de proyección fuera del STR, sino que distribuyen sus axones localmente, la mayoría de los cuales hacen contacto sináptico con las MSN (Grofová, 1975; Goodman y Packard, 2017). Las MSN son neuronas GABAérgicas y pueden dividirse en MSN estriatonigrales y MSN estriatopalidales dependiendo de los receptores que presentan y sus proyecciones (Kreitzer y Malenka, 2008). Las MSN estriatonigrales exhiben una alta expresión de receptores a dopamina D1 y receptores muscarínicos M4 y proyectan sus axones al globo pálido medial (GPM) y la sustancia nigra pars reticulata (SNpr), conformando la vía directa de salida de información del STR. Por

otro lado, las MSN estriatopalidales exhiben una alta expresión de receptores a dopamina D2 y receptores a adenosina A2A y sus vías de proyección tienen varios relevos que incluyen el núcleo subtalámico (NST), el GPM y la SNpr conformando la vía indirecta de salida (Gerfen *et al.*, 1990; Kreitzer y Malenka, 2008).

El efecto neto de la activación de la vía directa es la disminución de la inhibición talámica, lo que lleva a la activación de los circuitos premotores corticales y la selección o facilitación del movimiento, mientras que la activación de la vía indirecta mantiene la inhibición de las neuronas de proyección talamocorticales, reduciendo la actividad motora (Fuccillo, 2016; Kreitzer y Malenka, 2008).

2.2.2 Núcleo accumbens

El NAc corresponde a la región más ventral del STR en ratas y al igual que la región dorsal, presenta una organización anatómica heterogénea de MSN. Sin embargo, a través del uso de marcadores histoquímicos se ha propuesto que el NAc está conformado por una porción dorsal denominada NAc core y una región más medial denominada NAc shell (Park *et al.*, 2019).

El NAc core consiste en células pequeñas densamente empaquetadas que expresan una gran cantidad de calbindina D28K (CB), encefalina, ácido γ -aminobutírico y una inmunotinción débil de la sustancia P (Voorn *et al.*, 2004). Por el contrario, el NAc shell está compuesto de células grandes y segregadas que expresan niveles débiles de inmunorreactividad a CB, pero niveles elevados de inmunorreactividad a la sustancia P, neurotensina, DA, calretinina, TH y serotonina en varias especies de mamíferos (Voorn *et al.*, 2004).

Tanto la región core y shell del NAc reciben información aferente del AVT, así como del hipocampo, la amígdala basolateral (BLA) y diferentes subregiones de la CPF (Floresco, 2015). Sin embargo, además de que hay claras distinciones entre las proyecciones de la porción core y shell (Park *et al.*, 2019) y una disociación funcional en diferentes tareas conductuales de ambas regiones (Fenu *et al.*, 2001; Kelley, 2004), se ha sugerido que ambas estructuras procesan información fuertemente relacionada con eventos gratificantes y que la región del NAc shell podría estar

vigorizando ciertas respuestas de comportamiento que se coordinan a través del NAc core (Voorn *et al.*, 2004).

2.2.3 Substancia nigra

La substancia nigra (SN) es una estructura cerebral ubicada dorsalmente al pedúnculo cerebral en la base del mesencéfalo y que de acuerdo con la identidad, características morfológicas y conectividad de sus células puede dividirse en la SN pars reticulata (SNpr) y la SN pars compacta (SNpc).

La SNpr está conformada principalmente por neuronas GABAérgicas pequeñas y típicamente multipolares, con somas redondos o triangulares que se encuentran más difusamente distribuidas a lo largo de la parte ventral de la estructura y donde el receptor a dopamina D1 es el más abundante (Halliday *et al.*, 2012; Smith y Masilamoni, 2010).

Por otro lado, la SNpc está constituida por una gran cantidad de neuronas dopaminérgicas de tamaño mediano a grande, triangulares y multipolares altamente agregadas a lo largo de la parte dorsal de la estructura, que expresan en gran medida autoreceptores a dopamina D2 y que proyectan tanto a las MNS del STR como a la CPF (Groenewegen, 2003).

2.2.4 Área ventral tegmental

Se han caracterizado ampliamente dos poblaciones principales de neuronas dopaminérgicas y GABAérgicas en el AVT; sin embargo, en años recientes se ha descrito que también existe una subpoblación de neuronas glutamatérgicas (Halliday *et al.*, 2012; Yamaguchi *et al.*, 2006).

Aunque las principales poblaciones de neuronas del AVT emiten señales mediante la liberación de dopamina, GABA o glutamato, se ha reportado que algunas neuronas co-liberan dopamina y glutamato, dopamina y GABA, o glutamato y GABA; sin embargo, los mecanismos subyacentes que determinan la liberación de cada neurotransmisor y el significado funcional de estas neuronas son actualmente desconocidos (Morales y Margolis, 2017).

Las MNS del NAc y las interneuronas GABAérgicas de la CPF medial son el principal objetivo de las aferencias dopaminérgicas del AVT, especialmente de las neuronas duales que liberan dopamina y glutamato, tanto en ratas como en ratones (Morales y Pickel 2011; Pickel *et al.*, 1998; Stuber *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2011). Sin embargo, otras regiones como la amígdala, el hipocampo, el núcleo pálido ventral, el núcleo gris periacueductal, el tubérculo olfatorio y el locus coeruleus también reciben aferencias dopaminérgicas del AVT (Lammel *et al.*, 2008; Mingote *et al.*, 2015; Morales y Margolis, 2017).

2.2.5 Bulbo olfatorio

En roedores, la detección olfativa apropiada es esencial para encontrar alimento, explorar un ambiente novedoso, la interacción social y durante las conductas relacionadas al cortejo y apareamiento (Fine y Riera, 2019; Spinella, 2002) y, aunque el bulbo olfatorio no forma parte del sistema dopaminérgico, se sabe que en esta región existen células dopaminérgicas que están involucradas en el procesamiento de olores (Capsoni *et al.*, 2021).

De manera general, el procesamiento de los olores comienza cuando los odorantes son detectados y reconocidos por los receptores expresados en las neuronas sensoriales olfativas (NSO) ubicadas en el epitelio olfatorio. Después de que se unen a su receptor específico, la información se traduce a una señal eléctrica que luego llega al bulbo olfatorio (BO) donde tiene lugar el primer procesamiento de las señales sensoriales y posteriormente, a través de las neuronas de proyección, la señal llega a áreas cerebrales de alto orden como la capa plexiforme superficial y la corteza piriforme donde se integra y se reconoce la información olfativa (Capsoni *et al.*, 2021; Shipley y Ennis, 1996).

La estructura anatómica del BO consta de cinco capas concéntricas de células y fibras (Figura 4). La primera es la capa del nervio olfatorio (CNO) que se sitúa en la superficie del BO y está formada por las proyecciones aferentes del epitelio olfatorio. Las terminales de estos axones entran a la segunda capa, la capa glomerular (CGL), donde los axones de las NSO constituyen el núcleo de unas estructuras llamadas glomérulos y crean sinapsis con las dendritas apicales de las

neuronas de proyección (células mitrales y empenachadas) y con interneuronas que rodean los glomérulos (células yuxtglomerulares; PGs). La tercera capa es la capa plexiforme externa (CPE), compuesta por el cuerpo celular de las células empenachadas, las dendritas basales de las células empenachadas y mitrales y las dendritas apicales del principal tipo de interneuronas, las células granulares (CGs). Los cuerpos celulares de las células mitrales se encuentran en la cuarta capa, la capa mitral (CM). La quinta capa, llamada capa plexiforme interna (CPI), contiene axones de células mitrales, axones colaterales de células empenachadas y dendritas de células granulares. Por último, la sexta capa está formada por los somas de las células granulares (capa granular, CGr) (Capsoni *et al.*, 2021).

Las células yuxtglomerulares se pueden dividir en células empenachadas externas (CEE), células superficiales de axón corto (CSAC) y células periglomerulares (CPGs) y las tres se caracterizan por la ausencia de proyecciones fuera del bulbo olfatorio (Nagayama *et al.*, 2014).

Las CEE se pueden clasificar en dos subtipos según su morfología. La primera subpoblación está representada por células sin dendritas secundarias y es la menos frecuente de las dos, mientras que la segunda subpoblación si presenta dendritas secundarias y generalmente se observan cerca del límite entre la CGL y la CPE (Nagayama *et al.*, 2014).

Las CSAC se caracterizan por expresar TH y tener axones interglomerulares largos que conectan un número variable de glomérulos (Liu *et al.*, 2016) por lo cual se cree que estas neuronas son las células más importantes en las conexiones interglomerulares (Aungst *et al.*, 2003; Kosaka y Kosaka, 2008).

Por otro lado, se ha observado que las CPGs también expresan TH, pero a diferencia de las CSAC, no presentan axones. A partir de esta observación anatómica, las CPGs se han clasificado en CPGs tipo 1 y tipo 2 según la naturaleza de la interacción sináptica que realizan con los terminales axónicos de las neuronas sensoriales olfativas (Kosaka *et al.*, 1998).

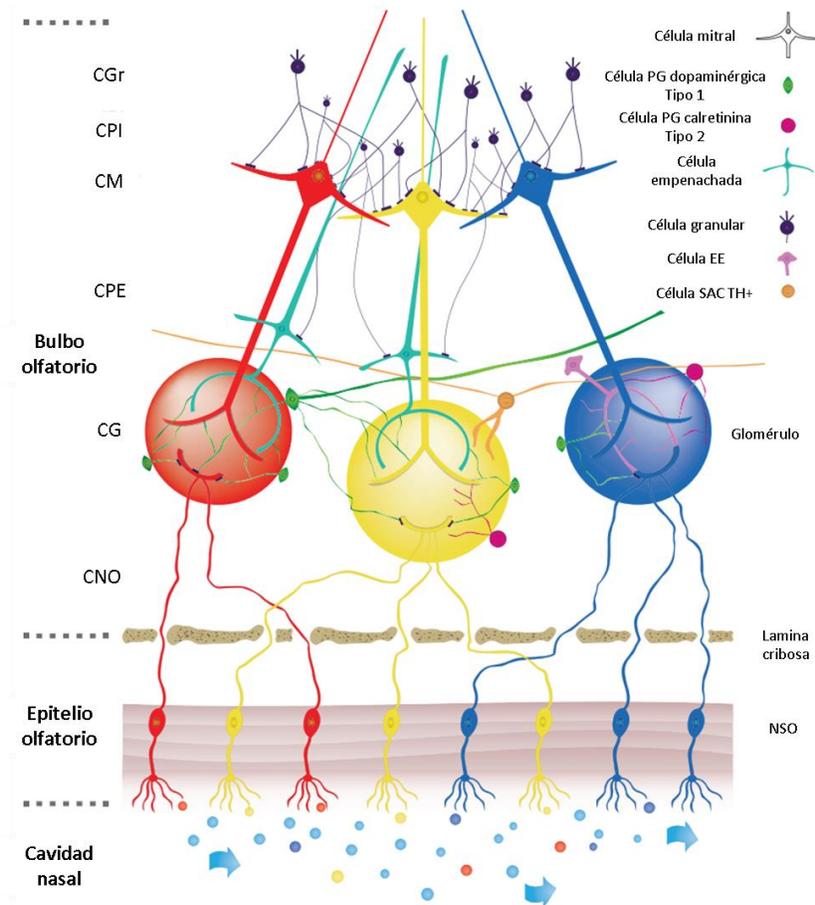


Figura 4. Vía esquemática de las principales conexiones neuronales en el BO. En la cavidad nasal, el flujo de aire transporta diferentes olores (representados por diferentes colores) a receptores olfativos específicos expresados en neuronas sensoriales olfativas (NSO) localizadas en el epitelio olfatorio. La información olfativa luego se transduce en una señal eléctrica que llega al bulbo olfatorio. Las neuronas sensoriales olfatorias envían sus axones a través de la lámina cribosa para llegar al núcleo de los glomérulos correspondientes. Dentro del núcleo glomerular, los axones de las NSO hacen sinapsis con las dendritas apicales de las células mitrales y empenachadas. En la periferia de los glomérulos se encuentran las células periglomerulares (PGs). Estas células proyectan su dendrita en el glomérulo y hacen sinapsis recíprocas con neuronas de proyección y algunas de ellas con axones de las NSO. Con base en sus conexiones sinápticas con los axones de las NSO, se describen dos subtipos de células PGs. Las células PG tipo 1, pertenecientes a las células PG dopaminérgicas, están conectadas sinápticamente tanto con los axones de las NSO como con las dendritas de otras neuronas del bulbo olfatorio. Por otro lado, las células PG de tipo 2, pertenecientes a las células PG de calretinina, no están conectadas sinápticamente con los axones de las OSN. Célula EE: empenachada externa. Modificado de Capsoni *et al.* (2021).

En los últimos años se han estudiado las interneuronas dopaminérgicas en el BO ya que: 1) son extremadamente plásticas (Baker *et al.*, 1983), 2) son células que anatómicamente se encuentran en la entrada del circuito bulbar, lo que sugiere un papel importante en el procesamiento del olor (Borisovska *et al.*, 2013) y 3) son células que se regeneran constantemente a lo largo de la vida (Lazarini *et al.*, 2014). En este sentido, cabe mencionar también que se ha reportado la presencia de los receptores a DA D1 y D2 en el bulbo olfatorio y que la DA puede ejercer un efecto inhibitorio sobre las fibras sensoriales olfativas después de unirse a los receptores presinápticos D2 (Capsoni *et al.*, 2021; Wachowiak y Cohen, 1999).

2.2.6 Dopamina

En las neuronas dopaminérgicas, la enzima TH convierte la tirosina en L-DOPA y la enzima dopa-descarboxilasa (DDC) convierte la L-DOPA en dopamina (DA). La liberación de DA en la hendidura sináptica da como resultado la activación de receptores a DA tipo D1 (D1 y D5) y tipo D2 (D2, D3 y D4) que se encuentran tanto en la neurona presináptica (D2r) y postsináptica (D1r y D2r) en distintas poblaciones neuronales. Posteriormente el transportador de DA presináptico (DAT) se encarga de la rápida eliminación (recaptación) de la DA del espacio extracelular y varias enzimas median la descomposición de la DA en dos metabolitos inactivos (Stoof y Keabian, 1984). Por un lado, la enzima monoamina oxidasa (MAO), que tiene dos isoformas (MAO-A y MAO-B), transforma la DA citosólica en ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), mientras que la catecol-O-metiltransferasa (COMT) convierte la DA restante en el medio extracelular en ácido homovanílico (HVA) (Loke, Harley y Lee, 2015) (Figura 4).

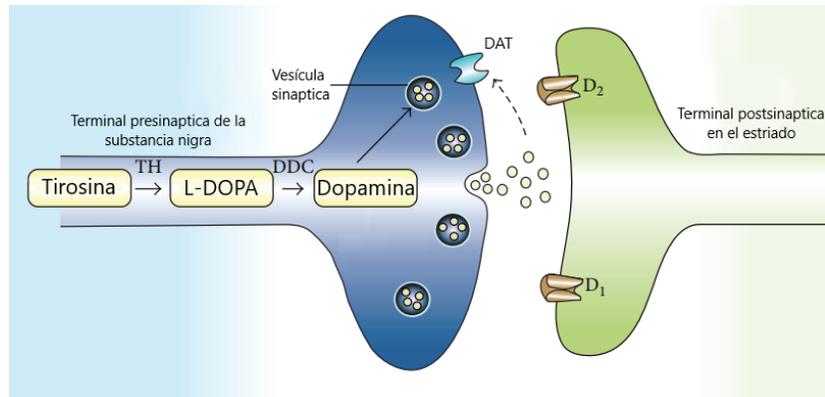


Figura 5. Síntesis de dopamina. El diagrama muestra el proceso y las enzimas implicadas en la síntesis de dopamina en la terminal presináptica de una neurona dopaminérgica de la SN. TH: Tirosina hidroxilasa; DDC: Dopa-decarboxilasa; DAT: transportador de dopamina. Modificado de Juárez Olguín *et al*, (2016).

2.3 Efectos de la atrazina en sistemas dopaminérgicos

2.3.1 Efectos neuroquímicos de la ATR en roedores

En ratones macho de la cepa C57BL/6 se ha observado que la exposición a 125 o 250 mg de ATR/kg de peso por 14 días provoca una reducción en la concentración de DA estriatal y sus metabolitos (Coban y Filipov, 2007). Mientras que en ratas macho de la cepa Sprague-Dawley se ha reportado que la exposición crónica a 10 mg de ATR/kg de peso por vía oral durante un año (Bardullas *et al.*, 2011, 2013) o la exposición aguda a ATR (seis inyecciones intraperitoneales de 100 mg de ATR/kg de peso) por un periodo de dos semanas (Rodríguez *et al.*, 2013), también provocan un decremento en la concentración de DA y sus metabolitos en el STR.

De manera similar, se ha reportado que la exposición a 50 o 100 mg de ATR/kg de peso durante 3 meses provoca un decremento en el RNAm y la expresión de la enzima TH en el STR (Song *et al.*, 2015) y la exposición repetida a ATR (seis inyecciones intraperitoneales de 100 mg de ATR/kg de peso) por dos semanas provoca una disminución en los niveles de RNAm de TH y el DAT, además de una disminución del transportador vesicular de monoaminas (*VMAT2*; por sus siglas en inglés) en el mesencéfalo ventral (Rodríguez *et al.*, 2013). Este mismo protocolo de exposición a ATR causa disminución de la unión específica del antagonista [³H]-

SCH23390 a los receptores de dopamina D1 en el STR (Márquez-Ramos *et al.*, 2017).

Además, la exposición durante el desarrollo a 10 o 100 mg de ATR/kg de peso provoca una reducción dosis dependiente en la expresión de receptores a DA tipo D1 en el hipocampo (Li *et al.*, 2018, 2019) y la exposición a 50, 100 o 200 mg de ATR/kg de peso provoca una disminución dosis dependiente en la concentración de DA y L-DOPA estriatal, así como un decremento en la expresión de Nurr1 y NulP, elementos importantes en la regulación del desarrollo de neuronas dopaminérgicas, tanto en el STR como en la SN (Li *et al.*, 2015).

Y en cuanto a otros sistemas de neurotransmisión, recientemente, Chávez-Pichardo *et al.* (2020) reportó que en ratas expuestas a 1 mg o 10 mg de ATR/kg de peso durante 14 meses se observaron alteraciones en los niveles de glutamato y/o GABA en distintas regiones cerebrales como el STR, el NAc, la amígdala, el mesencéfalo ventral y la CPF.

2.3.2 Efectos de la ATR en la morfología cerebral en roedores

En cuanto a los efectos en la morfología producidos por la exposición a ATR se ha reportado que tanto en ratones macho de la cepa C57BL/6 expuestos a 25, 125 o 250 mg de ATR/kg de peso durante 14 días (Coban y Filipov, 2007) así como en ratas de la cepa Sprague-Dawley expuestas a 10 mg de ATR/kg de peso por un año (Bardullas *et al.*, 2013), se observa una reducción en el número de células positivas a TH en la SNpc. También se ha reportado que en ratas macho de la cepa Sprague-Dawley la exposición a 50 o 100 mg ATR/kg de peso por 3 meses provoca un efecto neurodegenerativo (condensación apoptótica de la cromatina y autofagia mitocondrial) de manera dosis dependiente en las células del STR, así como una reducción en el número de neuronas TH+ (Song, *et al.*, 2015). Daños similares se han observado después de la exposición por 30 días a 10 o 100 mg de ATR/kg de peso en el hipocampo, además de hendiduras sinápticas difusas y un aumento dosis dependiente en el número de lisosomas (Li *et al.*, 2019).

2.3.3 Efectos conductuales de la ATR en roedores

En ratones macho adultos de la cepa C57BL/6 se observó que la exposición a 5, 25, 125 o 250 mg de ATR/kg de peso provoca un decremento en la actividad locomotora a los cuatro días de exposición en los grupos tratados con dosis de 125 y 250 mg de ATR/kg de peso, así como un déficit dosis dependiente en todos los grupos en una tarea de reconocimiento de objetos a los 9 días de exposición (Lin *et al.*, 2013).

En ratas macho de la cepa Sprague-Dawley se ha demostrado que la exposición aguda a ATR, ya sea mediante una única inyección o seis inyecciones intraperitoneales de 100 mg ATR/kg de peso por un periodo de dos semanas provocan hipoactividad (Rodríguez *et al.*, 2013; 2017) y el mismo efecto fue reportado por Walters *et al.* (2015) pero después de una exposición oral de 10 mg ATR/kg de peso diaria por 6 meses. Sin embargo, Bardullas *et al.* (2011) reportaron que la exposición a la misma dosis de ATR, pero durante un año, provocó un deterioro de la coordinación motora y una mayor actividad locomotora espontánea, además de un déficit en la memoria espacial de los sujetos. Mientras que Chávez-Pichardo *et al.* (2020) solo reportó alteraciones en el plano vertical de la actividad locomotora de ratas tratadas durante 12 meses a 10 mg ATR/kg. Cabe mencionar que la exposición a 10 o 100 mg de ATR/kg de peso durante el desarrollo también provoca un déficit de la memoria espacial (Li *et al.*, 2018, 2019).

Chávez-Pichardo *et al.* (2020) reportaron que al tratar a ratas macho de la cepa Sprague-Dawley durante 14 meses con 1 o 10 mg ATR/kg de peso y someterlos a una prueba de laberinto en cruz elevado, tanto los sujetos tratados con 1 o 10 mg ATR/kg de peso pasaban menos tiempo en los brazos abiertos en comparación con el grupo control, lo cual se asocia como un aumento en la ansiedad de los animales.

2.4 Diferencias experimentales entre machos y hembras

Las mujeres y las hembras de mamíferos no humanos han recibido poca atención y se han excluido en gran medida de la investigación científica asumiendo que los resultados obtenidos en machos se aplican a las hembras, con excepción de las investigaciones sobre el comportamiento reproductivo específico del sexo. Esto se

debe a la preocupación de que los ciclos hormonales disminuyan la homogeneidad de las poblaciones de estudio y confundan los efectos de las manipulaciones experimentales (Emanuele *et al.*, 2002; Wizemann y Pardue, 2001). Sin embargo, en años recientes cada vez son más los trabajos de investigación donde se han observado diferencias dependientes del sexo, tanto en humanos como en modelos animales, en la actividad general y en una serie de pruebas conductuales de ansiedad y depresión, así como en diversas tareas cognitivas y de aprendizaje (Simpson y Kelly, 2012).

En humanos, estudios epidemiológicos y clínicos han reportado diferencias dependientes del sexo en la respuesta a muchas drogas, así como en el patrón y prevalencia de ciertas enfermedades del SNC (Soldin y Mattison, 2009).

Se ha reportado que las mujeres tienden a tener mayores tasas de prevalencia de Alzheimer que los hombres, además de un inicio más temprano de la enfermedad y una patología general mayor (Rebecca *et al.*, 2018). La depresión es dos veces más común en mujeres que en hombres y corren el riesgo de sufrir trastornos depresivos durante las épocas de cambios hormonales reproductivos, como la menstruación, el embarazo, el posparto y la menopausia (Soares y Zitek, 2007). Y el riesgo de desarrollar EP es el doble en hombres que en mujeres, pero las mujeres tienen una tasa de mortalidad más alta y una progresión más rápida de la enfermedad (Cerri, Mus y Blandini, 2019).

En animales de laboratorio cada vez hay más evidencia de que las hormonas sexuales pueden desempeñar un papel en la conducta y procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria (Frick *et al.*, 2015; Simpson y Kelly, 2012). Por ejemplo, se ha reportado que cuando se evalúa la ansiedad basal de ratas macho y hembra bajo el mismo paradigma, las ratas macho tienden a mostrar un perfil más ansioso que las hembras (Simpson y Kelly, 2012), pero a su vez las ratas hembra expresan diferentes índices de ansiedad dependiendo de la fase del ciclo estral (Marcondes *et al.*, 2001; Mora, Dussaubat y Diaz-Veliz, 1996).

En la prueba de campo abierto se ha reportado que la actividad locomotora basal de las ratas hembra generalmente es más alta que la de los machos (Elliott y Grunberg, 2005; Padilla *et al.*, 2009) y que, en comparación a los estudios de ansiedad, el ciclo estral no influye en la distancia que recorren los sujetos o el porcentaje de tiempo que pasan en el centro de la caja de registro (Hiroi y Neumaier, 2006).

En tareas de aprendizaje y memoria se ha reportado que al medir la memoria espacial de los sujetos utilizando la prueba del laberinto acuático de Morris las ratas macho presentan una ventaja significativa sobre las hembras en el desempeño de esta tarea, sin embargo, cuando se emplean protocolos de pre-entrenamiento para reducir el estrés, estas diferencias entre machos y hembras tienden a disminuir (Jonasson, 2005). De manera similar, en estudios donde se emplea el laberinto radial para evaluar la memoria de trabajo de los sujetos las ratas macho muestran un mejor desempeño en el rendimiento de la tarea sobre las hembras (Jonasson, 2005; Simpson y Kelly, 2012).

Por otro lado, se ha reportado que las diferencias de sexo en los paradigmas de condicionamientos clásico y operante se rigen por los requisitos de la tarea ya que en los procedimientos en los que se recompensa la evitación activa, las hembras se desempeñan mejor que los machos, mientras que, por el contrario, cuando se recompensa la respuesta pasiva, los machos superan a las hembras (Albonetti y Farabollini, 1995; Pryce, Lehmann y Feldon, 1999).

En el ámbito de la neurotoxicología, desde hace tiempo se conoce que las influencias genéticas derivadas del sexo de los individuos juegan un papel importante en la susceptibilidad a agentes neurotóxicos, pero no fue hasta años recientes que se están llevando a cabo investigaciones en las cuales se incluye el sexo como una variable biológica. Descubrir los factores genéticos y de predisposición sexual de la susceptibilidad a las neurotoxinas no solo ayudará a identificar a los individuos con mayor riesgo de padecer problemas neurodegenerativos, sino que también ampliará la comprensión de los mecanismos por los cuales los tóxicos afectan la función neurológica.

2.4.1 Efectos tóxicos dependientes del sexo por la exposición a pesticidas

Se ha sugerido un efecto sexo-dependiente de los plaguicidas en el desarrollo, así como a nivel anatómico, fisiológico y conductual en diferentes organismos. Por ejemplo, se han reportado alteraciones dependientes del sexo en el desarrollo del cerebro después de la exposición gestacional al fungicida procloraz en conejos (Bisenius *et al.*, 2006) y ratas (Vinggaard *et al.*, 2005). En humanos, la exposición ocupacional materna a plaguicidas, al principio del embarazo, se asocia con una función neuropsicológica general deficiente en las niñas entre los 6 y 11 años, pero no en los niños (Andersen *et al.*, 2015).

Actualmente existe una creciente evidencia de que los machos son más susceptibles que las hembras a los efectos adversos de los pesticidas, excepto por algunos efectos sobre la función motora que afectan preferentemente a las hembras (Torres-Rojas y Jones, 2018).

Se ha reportado que la exposición a insecticidas como el dimetoato (DMT) altera la función de los astrocitos en ratones macho CD1, pero no en hembras (Astiz *et al.*, 2013). En estudios conductuales en ratas de la cepa Wistar se observó que la exposición durante el desarrollo a los insecticidas endosulfán y cipermetrina afectan la coordinación motora solo en las hembras, mientras que, en machos, la exposición durante el mismo periodo al insecticida y acaricida endosulfán afectan la actividad locomotora espontánea (Gómez-Giménez *et al.*, 2018) y provoca un aumento en la ansiedad y deterioro del aprendizaje espacial y asociativo (Gómez-Giménez *et al.*, 2017).

2.4.2 Efectos tóxicos dependientes del sexo por la exposición a ATR

En cuanto a los efectos diferenciales dependientes del sexo de la ATR, se ha reportado que en la araña *Pardosa milvina* tanto los machos como las hembras pasan más tiempo en movimiento, pero a velocidades más bajas en presencia de ATR y que, conforme aumenta la dosis de ATR, se reduce el tiempo de cortejo de los machos (Godfrey y Rypstra, 2019). En el pez dorado macho *Carassius auratus*, la exposición a 1000 µg de ATR/L indujo la supresión tanto de la testosterona como de la 11-cetotestosterona a la vez que indujo el aumento de 17beta-estradiol

después de 21 días de exposición (Spanò *et al.*, 2004) y en ratas Fisher una dosis diaria de 120 mg de ATR/kg de peso administrada de forma oral durante 7 días causa la pérdida de peso corporal tanto en machos como en hembras durante el período de tratamiento, además de un aumento significativo en los pesos relativos de la hipófisis y la próstata de los machos y una desregulación en el ciclo estral de las hembras (Šimić *et al.*, 1994).

A nivel del sistema nervioso central se ha observado que una dosis de 100 µg ATR/kg de peso en ratones CD1 durante la etapa gestacional y el desarrollo provoca un aumento en el RNA mensajero del receptor a somatostatina tipo 2 en el núcleo supraquiasmático y un decremento en el núcleo central de la amígdala en las hembras, pero no en los machos. Mientras que la expresión del RNA mensajero del receptor a somatostatina tipo 3 presentó un incremento en el núcleo arcuato hipotalámico y un decremento en la capa cortical III. Cabe mencionar que la somatostatina es un neuropéptido importante que al interactuar con el sistema GABAérgico modula la secreción de la hormona del crecimiento, importante para evitar daños cerebrales tempranos (Giusi *et al.*, 2006).

En *Drosophila melanogaster* se ha reportado que la exposición a 10 µM o 100 µM de ATR durante el desarrollo embrionario y larvario provoca un aumento en el tiempo de inmovilidad y una reducción en la actividad exploratoria, así como un aumento en la expresión del RNA mensajero de la enzima DOPA descarboxilasa y de los receptores a DA (dop2r, dopecr, dop1r1 y dop1r2) en hembras, pero no en machos (Hernandes *et al.*, 2017).

2.4.3 Diferencias dependientes del sexo en el sistema dopaminérgico de roedores

Una gran cantidad de evidencia apunta a que en diferentes puntos de señalización de la DA (que incluyen síntesis, liberación, recaptación y respuestas postsinápticas) hay ejemplos de efectos dependientes del sexo que pueden estar, aunque no siempre, relacionados con la modulación de hormonas sexuales circundantes (Becker y Chartoff, 2019).

Por ejemplo, Andersen *et al.* (1997) reportaron que los machos, pero no las hembras, presentan una mayor cantidad de receptores D1 y D2 en el STR durante el desarrollo seguido de una poda antes de la edad adulta, pero que ni la sobreproducción y poda de los receptores de DA en los machos, ni la falta de sobreproducción en las hembras se deben a la presencia de hormonas sexuales (Teicher *et al.*, 2003). Sin embargo, se ha reportado que durante la pubertad los esteroides gonadales regulan la liberación de DA en el STR dorsal de las hembras, pero no de los machos (Becker y Ramírez, 1981).

Además, experimentos *in vivo* e *in vitro* indican que, aunque la afinidad del transportador de DA en machos y hembras es la misma, tanto la liberación como la recaptura de DA en el STR después de una estimulación eléctrica es mayor en hembras que en machos, y que ninguno de los dos parámetros varía a lo largo del ciclo estral femenino (Walker *et al.*, 2000). Sin embargo, en otro trabajo se reportó que ratas Sprague-Dawley hembra presentaron significativamente mayor DA estriatal extracelular durante las fases de estro y proestro que en el diestro o después de la ovariectomización; sin embargo, la castración no tiene efecto en la DA extracelular de machos (Xiao y Becker, 1994). Y también se ha demostrado que la concentración de DA en cultivos de células diencefálicas y mesencefálicas de embriones de rata, incluso en ausencia de cantidades detectables de hormonas sexuales, eran más altos en hembras que en machos (Beyer *et al.*, 1991).

III. Justificación

Si bien los efectos de la exposición aguda a la ATR o durante el desarrollo son conocidos, los impactos de exposiciones crónicas de bajo nivel que pudieran reflejar de manera más fehaciente los efectos reales de la ATR en la salud han sido poco estudiados (Alavanja, 2009). Estudios previos (Bardullas *et al.*, 2011, 2013) sugieren que la exposición a la ATR durante un año produce alteraciones en la actividad locomotora y en la fisiología del sistema dopaminérgico en ratas macho de la cepa Sprague-Dawley; sin embargo, debido a las diferencias dependientes del sexo en la anatomía del sistema dopaminérgico y en los efectos fisiológicos y conductuales demostrados en distintos modelos experimentales producto de la

exposición a diversos pesticidas, es importante evaluar si la exposición crónica a la ATR provoca las mismas alteraciones en el sistema dopaminérgico de la rata hembra Sprague-Dawley, y si estas alteraciones se correlacionan con el contenido de DA y sus metabolitos en estructuras blanco de las vías dopaminérgicas.

IV. Hipótesis

- 1) La exposición crónica a ATR provocará alteraciones en conductas relacionadas con los sistemas dopaminérgicos de ratas hembra Sprague-Dawley.
- 2) La exposición crónica a ATR provocará alteraciones en los niveles de monoaminas evaluadas en las estructuras que conforman los sistemas dopaminérgicos de ratas hembra Sprague-Dawley.
- 3) Las alteraciones en la conducta y en los niveles de monoaminas serán mayores en las ratas hembra Sprague-Dawley expuestas a 10 mg de ATR/kg de peso comparado con las ratas expuestas a 1 mg de ATR/kg de peso o el grupo control.

V. Objetivos

- 1) Evaluar el efecto de la exposición crónica a 1 o 10 mg de ATR/kg de peso en la conducta de ratas hembra Sprague-Dawley mediante tareas relacionadas con el funcionamiento adecuado de los sistemas dopaminérgicos.
- 2) Evaluar los efectos de la exposición crónica a 1 o 10 mg de ATR/kg de peso en el contenido de monoaminas en las estructuras que conforman los sistemas dopaminérgicos de ratas hembra Sprague-Dawley.

VI. Método

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con los lineamientos bioéticos del Instituto de Neurobiología en la Universidad Nacional Autónoma de

México para el uso de animales experimentales, bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

6.1 Sujetos

Se utilizaron 36 ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley recién destetadas (21 días postnatales) con un peso inicial de 30-50 g, obtenidas del bioterio del Instituto de Neurobiología, UNAM.

La intoxicación se realizó por vía oral (alimento mezclado con el herbicida ATR) durante catorce meses y para ello los animales se dividieron en 3 grupos experimentales de 12 sujetos cada grupo:

1.- Control

2.- 1 mg ATR/kg de peso

3.- 10 mg ATR/kg de peso

Cada individuo se colocó en una caja individual con un ciclo invertido de luz/oscuridad (luz de las 20:00 h a las 8:00 h) y se controló la ingesta de alimento de manera que los grupos tratados con ATR recibieron la cantidad diaria de 1 o 10 mg ATR/kg de peso, respectivamente.

Una vez que las ratas alcanzaron los 220 g de peso, se pesaron semanalmente y el acceso al alimento se controló para mantener al animal en este peso, mientras que el agua se mantuvo *ad libitum* durante los 14 meses del experimento.

6.2 Preparación de croquetas con atrazina

Para la preparación del alimento con ATR, se pesaron 1000 g de alimento para rata (LabDiet 5001), y se dejó remojando en agua desionizada durante 1 día, posteriormente, se pesó la cantidad respectiva de ATR para los grupos de 1 mg ATR/kg (0.030 g de ATR/kg) o 10 mg ATR/kg (0.300 g de ATR/kg) y se mezcló con el alimento para posteriormente hacer pequeñas croquetas que se colocaron en un horno a 80°C durante dos días. Las ratas control recibieron alimento comercial (LabDiet 5001).

6.3 Tareas conductuales

6.3.1 Evaluación neurológica

En el mes seis, ocho, diez y doce del experimento se evaluó cualitativamente la apariencia general del animal y cuantitativamente diversos parámetros sensoriales y motores de acuerdo con los protocolos de Deckel *et al.*, (1986); Dunnet *et al.*, (1987).

Evaluación sensorial

Para evaluar el efecto de la exposición a la ATR en las respuestas sensoriales de los sujetos se realizó una evaluación sensorial de 5 parámetros distintos como se describe a continuación:

Orientación de las vibrisas. - Se tocan momentáneamente las vibrisas de la rata con un objeto de plástico y se registra la magnitud de la respuesta de orientación de la rata hacia el objeto.

Olfato. - Se acerca a la nariz de la rata un aplicador de madera con un extremo cubierto de algodón humedecido con agua (no irritante) o xilol (irritante) y se observa la respuesta de acercamiento o alejamiento antes estos estímulos.

Estímulo suave y afilado. - Utilizando un lápiz se aplica un estímulo de presión con la parte de goma y un estímulo punzante momentáneo con la punta afilada en cuatro superficies de cada lado de su cuerpo (articulaciones superiores de las patas traseras y delanteras, costillas y abdomen) registrándose la orientación de la rata a cada estímulo.

Tono muscular. - Se manipula individualmente cada una de las cuatro extremidades de la rata para evaluar su resistencia a la flexión pasiva.

Comportamiento en campo abierto. - Se coloca a la rata en una mesa durante un minuto y se registran los movimientos de cabeza hacia los lados, hacia arriba y hacia abajo.

Cada respuesta se calificó bajo el siguiente criterio:

- 0 = respuesta débil

- 1 = respuesta moderada
- 2 = respuesta fuerte.

Al final, para obtener la calificación de esta evaluación se sumaron los puntos obtenidos en los diferentes parámetros siendo la calificación máxima esperada para una rata normal de 14 puntos.

Evaluación motora

Se realizó una evaluación de tres respuestas motoras para evaluar el efecto de la exposición a la ATR en este parámetro como se describe a continuación:

Postura general. - Se coloca a la rata en la superficie de una mesa y se observa la postura general durante un minuto, evaluándose de la siguiente manera:

- 2 = postura normal.
- 1 = mantiene la mandíbula sobre la superficie de la mesa.
- 0 = arco exagerado en la espalda.

Orientación de las extremidades. - Se sujeta al animal por la cola y se califica la orientación de las extremidades de la siguiente manera:

Patatas anteriores:

- 4 = Las patas se orientan hacia adelante (normal).
- 3 = las patas se desvían hacia atrás más de 45 grados.
- 2 = las patas se desvían más de 90 grados.
- 1 = las patas se desvían más de 135 grados.
- 0 = las patas del animal quedan flexionadas al cuerpo.

Patatas posteriores:

- 4 = las patas se orientan hacia afuera (normal).
- 1 punto por cada 15 grados que las patas se desvían de la postura normal con un puntaje máximo de 3.
- 0 = las patas permanecen flexionadas al cuerpo.

Colocación de las extremidades en una superficie plana. - Se sujeta al animal de la cola y se acerca lentamente a la superficie plana de una mesa. Se califica la colocación de las extremidades anteriores en la superficie de la mesa de la siguiente manera:

- 2 = la rata extiende las patas hacia la superficie de la mesa antes de tocarla.
- 1 = no extiende las patas, pero las extiende al acercarse a la superficie cuando sus vibrisas tocan la mesa.
- 0 = no extiende sus patas hacia la mesa.

Para obtener la calificación de esta evaluación se sumaron los puntos obtenidos en los diferentes parámetros siendo la calificación esperada para una rata normal de 10 puntos.

6.3.2 Actividad locomotora

Se evaluó la actividad locomotora de las ratas mensualmente durante los primeros 12 meses de exposición a la ATR. Para ello, las ratas se colocaron mensualmente de manera individual, con agua y comida *ad libitum*, en una cámara de actividad locomotora [Digiscan Animal Activity Monitors, Acussan Inc. (Colombus, Ohio, USA)] que consiste en una caja de acrílico transparente de 40 x 40 x 30 cm equipada con detectores infrarrojos que por medio de un software registran distintos parámetros de actividad durante 25 horas, descartando la primera hora de registro que es el tiempo que el animal emplea para explorar la caja.

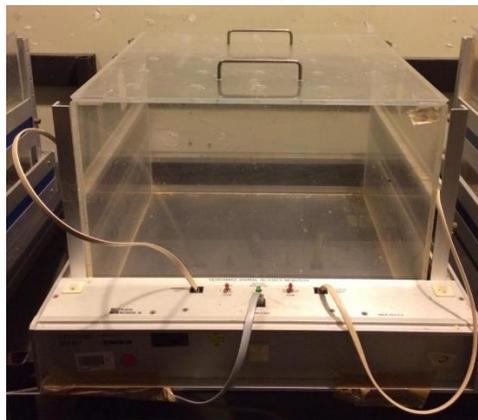


Figura 6. Caja de actividad locomotora espontánea (Digiscan Animal Activity Monitors).

Específicamente, las variables que se analizaron en esta prueba fueron las siguientes:

Distancia total. - Indica la distancia recorrida (cm) por el animal en un tiempo de muestreo determinado (actividad ambulatoria).

Número de estereotipias. - Indica el número de veces que el sistema capta comportamiento estereotipado en el animal. Se requiere que el movimiento dure 1 segundo o más para separar un episodio estereotipado del siguiente.

Actividad vertical. - Indica el número de interrupciones en el sensor vertical en un tiempo de muestreo determinado

Actividad horizontal. - Indica el número total de interrupciones en el sensor horizontal en un tiempo de muestreo determinado.

Número de movimientos. – Es el número de movimientos horizontales realizados por la rata en un tiempo de muestreo determinado. Los movimientos individuales están separados uno de otro por un periodo de reposo de al menos un segundo.

Tiempo en movimiento. - Es el tiempo (segundos) que el animal está en actividad ambulatoria durante un periodo de tiempo determinado.

Tiempo vertical. - Es el tiempo (segundos) que el animal se encuentra obstruyendo el sensor vertical al incorporarse, de esta manera la variable empieza a incrementar y continúa incrementando hasta que el animal está debajo del sensor vertical.

Cuentas estereotipadas. – Es el número de veces que el animal interrumpe repetidamente el mismo sensor durante la actividad estereotipada.

Tiempo de estereotipia. - Es la cantidad total del tiempo (segundos) en el que se observa el comportamiento estereotipado.

Distancia del margen. – Es la distancia (cm) que el animal recorre en el margen o esquina de la caja.

Distancia en el centro. – Es la distancia (cm) que el animal recorre mientras está en el centro de la caja (no en el margen o las esquinas).

6.3.3 Laberinto en cruz elevado

Para evaluar el efecto de la exposición a ATR en la ansiedad de los sujetos, se utilizó la prueba de laberinto elevado en cruz, la cual se basa en el conflicto del animal por permanecer en un área segura y evitar la exploración en áreas abiertas. Para ello, se utilizó un aparato elevado (50 cm con respecto al piso) formado por cuatro brazos (dos brazos abiertos y dos brazos cerrados). La prueba consistió en una sesión de 5 minutos para cada sujeto donde se colocó al animal en el centro del laberinto viendo hacia un brazo cerrado y se registró el tiempo que el animal pasó en los brazos abiertos y cerrados.

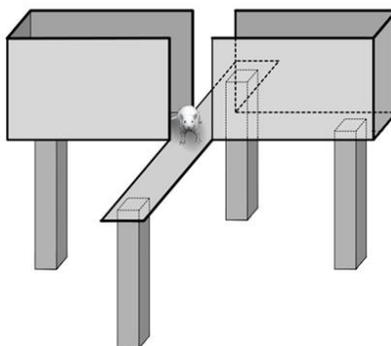


Figura 7. Laberinto elevado en cruz. Representación del aparato utilizado para medir la ansiedad de los sujetos.

6.3.4 Tarea de laberinto en T

Para valorar el efecto de la exposición a ATR en una tarea cognitiva que involucra la participación del STR, se entrenó a las ratas en una tarea de laberinto en T (llamado así por la similitud visual que mantiene con la letra “T”) que está constituido por 3 brazos de dimensiones idénticas con un eje de simetría y con dos ángulos de 90° y un ángulo de 180° entre los brazos.

Alternancia espontánea

Para evaluar los efectos de la ATR sobre la tendencia natural de los sujetos por alternar entre dos opciones se utilizó la versión de alternancia espontánea del laberinto en “T”.

Un día previo al entrenamiento, a cada sujeto se le permitió explorar libremente el laberinto durante una única sesión de 5 minutos. El día del entrenamiento se colocó a la rata en el compartimiento de inicio y se le dejó explorar libremente el laberinto registrando el brazo elegido (izquierda o derecha) para consumir un reforzador (una pastilla de azúcar). Una vez que el animal consumió el reforzador de uno de los brazos se registró el brazo elegido e inmediatamente se le retiró del laberinto, se limpió el aparato con ácido acético y se colocó un nuevo reforzador en el brazo elegido de tal forma que nuevamente el reforzador esté presente en ambos brazos. Una vez transcurrido 1 minuto se colocó nuevamente al animal en el brazo de salida permitiéndole elegir entre uno de los dos brazos y así sucesivamente hasta completar 10 ensayos durante 5 días consecutivos. Se registró como un error si la rata entró al compartimiento elegido en el ensayo anterior. Cabe mencionar que esta conducta de alternancia se ha asociado con la participación del STR y la CPF.

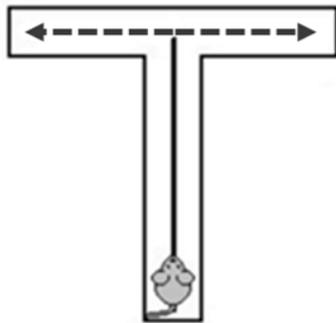


Figura 8. Alternancia espontánea. Representación del aparato utilizado para evaluar la tendencia natural de los sujetos por alternar entre dos opciones.

Alternancia forzada

Esta versión nos ayuda a evaluar la memoria egocéntrica del sujeto que también depende de la participación del STR y al igual que la versión anterior, durante el entrenamiento se colocó a la rata en el compartimiento de inicio y se le dejó explorar libremente el laberinto registrando el brazo elegido (izquierda o derecha) para consumir un reforzador. En el siguiente ensayo se cerró la puerta del compartimiento previamente visitado, dejando la entrada libre al compartimiento

restante y si la rata entró en el compartimiento abierto, éste se cerró en el siguiente ensayo y se reforzó el compartimiento contrario y así sucesivamente hasta completar 10 ensayos durante 5 días consecutivos. Se registró como un error si la rata entró al compartimiento cerrado.

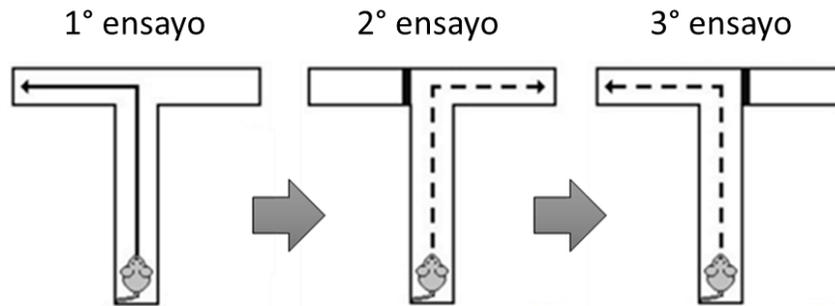


Figura 9. Alternancia forzada. Representación del aparato y el procedimiento realizado para evaluar la memoria egocéntrica de los sujetos.

6.3.5 Laberinto radial de 8 brazos

El laberinto radial de 8 brazos consta de una base octagonal que une a 8 brazos de acrílico en los cuales al final de cada brazo se encuentra un recipiente donde se coloca un reforzador. La habitación en donde se encuentra el laberinto cuenta con claves espaciales distribuidas en dirección a los brazos para facilitar la orientación del animal.

Variante gana y cambia

Para evaluar si la exposición a ATR provoca alteraciones en el aprendizaje espacial de los sujetos que es dependiente de la participación del hipocampo se realizó la variante gana y cambia del laberinto radial de 8 brazos. La tarea consistió en una sesión de habituación al laberinto por un periodo de 5 minutos sin reforzador un día previo al entrenamiento. El día del entrenamiento se colocó al animal en el centro de la plataforma octagonal del laberinto y se registraron las visitas a cada uno de los ocho brazos con un reforzador en sus extremos cada uno en un tiempo de 300 segundos, si antes de este tiempo la rata visitó los ocho brazos se dio por terminada la tarea. Se consideró como error si la rata entró a un brazo previamente visitado. La prueba consistió en dos ensayos por día durante 5 días consecutivos

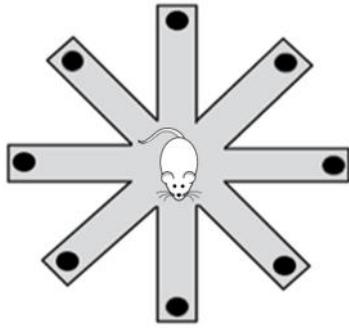


Figura 10. Gana y cambia. Representación del aparato utilizado para evaluar la memoria espacial de los sujetos.

Variante gana y cambia con retardo

Para evaluar si la exposición a ATR provocó afecciones en el NAc, se realizó la variante gana y cambia con retardo del laberinto radial de 8 brazos, la cual consiste en una fase de entrenamiento y una fase de prueba separadas por 5 minutos. Un día previo al día de entrenamiento se le permitió a cada animal explorar el aparato durante 5 minutos (sin reforzador) y en el día dos antes de la fase de entrenamiento se seleccionaron 4 brazos del laberinto de forma aleatoria donde se depositó el reforzador mientras que los 4 brazos restantes permanecieron cerrados. Durante el entrenamiento se colocó al animal en el centro de la plataforma octagonal del laberinto y se le permitió comer el reforzador que se encontraba en los brazos abiertos en un tiempo de 300 segundos. Posteriormente se retiró al animal durante 5 minutos, se limpió el laberinto con una solución de ácido acético al 1%, se colocó un reforzador en los brazos que estuvieron cerrados y se abrieron las puertas de los 8 brazos del laberinto. Por último, se depositó nuevamente al animal en el laberinto y se registraron los brazos a los que entró. Si la rata no entró a los brazos reforzados se le calificó como error. Esta prueba constó de un ensayo por día durante 5 días consecutivos.

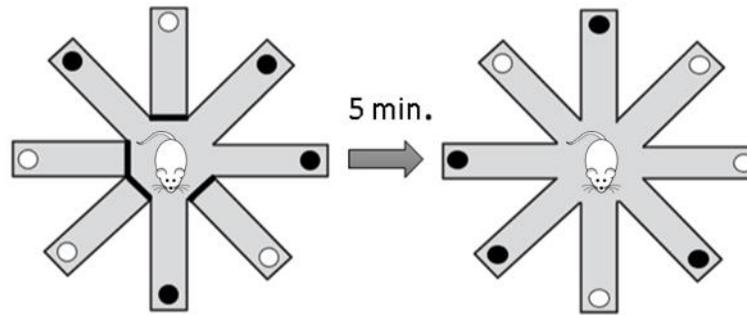


Figura 11. Gana y cambia con retardo. Representación del aparato y el procedimiento realizado para evaluar la memoria espacial de los sujetos.

6.3.6 Barra de equilibrio

Para evaluar la coordinación motora y el balance de los sujetos se utilizó la prueba de barra de equilibrio para la cual se emplearon dos barras de madera con superficie plana las cuales se colocaron a 75 cm de altura con respecto al piso. La primera barra se utilizó para la fase de entrenamiento (1.70 cm de largo x 7 cm de ancho x 2 cm de grosor) y la segunda para la fase de prueba (1.70 cm de largo x 7 cm de ancho x 1 cm de grosor) y en uno de los extremos se colocó una caja negra que sirvió como plataforma de escape.

En el primer día de entrenamiento cada animal fue obligado a caminar sobre la barra de dos centímetros de ancho desde cuatro posibles distancias de partida con respecto a la plataforma (20, 80, 120 y 150 cm) y se registró el tiempo que tardó cada animal en llegar a la misma. En el día 2 las ratas se colocaron nuevamente en la barra de dos centímetros, pero esta vez se liberaron solo desde los 20 y 150 cm de distancia con respecto a la plataforma y se registró la latencia de llegada. Por último, para el día 3 se empleó la barra de 1 cm de ancho y nuevamente se liberó a cada sujeto desde la distancia de 20 y 150 cm de distancia de la plataforma, registrando el tiempo que le tomó llegar hasta la misma. Además, cada sesión fue video grabada para contar los errores cometidos por cada animal en cada trayecto y un error fue definido como la falla que presentó el animal para agarrarse de la barra con cualquiera de sus extremidades traseras.



Figura 12. Barra de equilibrio. Representación del aparato utilizado para evaluar la coordinación motora fina de los sujetos.

6.3.7 Rodillo giratorio

Se evaluó la coordinación motora de los sujetos de los diferentes grupos experimentales utilizando el aparato IITC 755 ROTOROD (San Diego, CA, USA) el cual consiste en una estructura metálica con 5 cilindros internos de 3.75" de diámetro accionados por un motor y cada cilindro tiene adherida una superficie rugosa que le permite al animal sujetarse. El aparato proporciona el tiempo en el cual el animal cae del cilindro, así como la velocidad de giro del cilindro en revoluciones por minuto (rpm).

Un día previo al entrenamiento los animales se habituaron al aparato colocándolos en el cilindro a una velocidad constante de 4 rpm durante 2 minutos. Posteriormente, se entrenó a los animales durante 5 días consecutivos con dos sesiones diarias para permanecer en el cilindro giratorio de las cuales la primera sesión se llevó a cabo con una aceleración de 4 a 20 rpm durante 60 segundos, mientras que para la segunda sesión el cilindro giratorio se programó para acelerar de 4 a 45 rpm en 180 segundos y al final se registró la latencia de caída para cada animal en un tiempo total de evaluación de 300 segundos.

6.3.8 Habitación/discriminación olfativa

La capacidad olfativa general se evaluó mediante la prueba de habituación/discriminación olfativa para la cual se utilizaron dos olores no sociales (vainilla y plátano) que se eligieron por ser los olores más atractivos para las ratas en una sesión de prueba de 4 olores (naranja, plátano, vainilla y canela) y dos olores

sociales (aserrín sucio de macho o hembra en edad reproductiva). Para los olores no sociales se colocaron 20 μ l del olor a vainilla o a plátano (acetato de amilo) en un papel filtro de 2 cm de diámetro previamente pegados en tapas de tubos falcón de 50 ml mientras que los olores sociales se prepararon 10 minutos antes de cada prueba introduciendo un papel filtro en una bolsa ziploc con aserrín sucio de un macho o una hembra desconocidos.

De manera general la tarea consistió en colocar a cada rata en una caja estándar dándole un período de habituación de 10 minutos en el que se colocó una tapa con un papel filtro estéril sobre la rejilla de la caja. La sesión de prueba comenzó con dos ensayos consecutivos en los cuales se presentó un estímulo de olor neutro (aceite mineral) durante 2 minutos por ensayo, seguido de tres ensayos consecutivos de 2 minutos de duración de los olores no sociales y de los olores sociales presentados en un orden compensado. Cada ensayo se separó por un intervalo entre ensayos de 1 minuto en el que se retiró el estímulo de la tapa de la jaula y se preparó el siguiente ensayo/olor. Se evaluó el tiempo de exploración de los sujetos ante los diferentes olores en cada uno de los ensayos.

6.4 Determinación de monoaminas

Finalizadas las pruebas cognitivas y de coordinación motora se evaluó el ciclo estral de las ratas y se sacrificaron por decapitación para obtener sangre, extraer el cerebro y realizar la disección de las diferentes estructuras cerebrales que conforman los sistemas dopaminérgicos. Posteriormente, el tejido se congeló a -80°C para el análisis de monoaminas (DA y sus metabolitos DOPAC y HVA) por HPLC y se midieron las concentraciones de estradiol en sangre para descartar posibles influencias de dicha hormona en los niveles de monoaminas.

Se separaron las monoaminas en una columna C-18 (Alltima, HiChrom, England) con un tamaño de partícula de 3 μ m y una longitud de 100 mm x 4.6 mm de ancho, la cual se encuentra conectada a una bomba (Perkin Elmer series 200) por donde se inyecta la fase móvil isocrática, la cual está compuesta de 0.1 M de fosfato monobásico, 0.5 mM octil sulfato de sodio, 0.03 mM EDTA y 11-13% de metanol. La detección se realizó ajustando a un potencial amperométrico de 850 mV

relacionado a un electrodo de referencia Ag/AgCl y una sensibilidad de 2 nA. Los resultados generados se analizaron con el software TotalChrom Navigator versión 6.3.1.0504 (PerkinElmer, San José, CA. USA). Se utilizaron curvas de calibración externas para la determinación de las monoaminas.

El diseño experimental y la línea de tiempo para el presente trabajo están representados en la Figura 13.

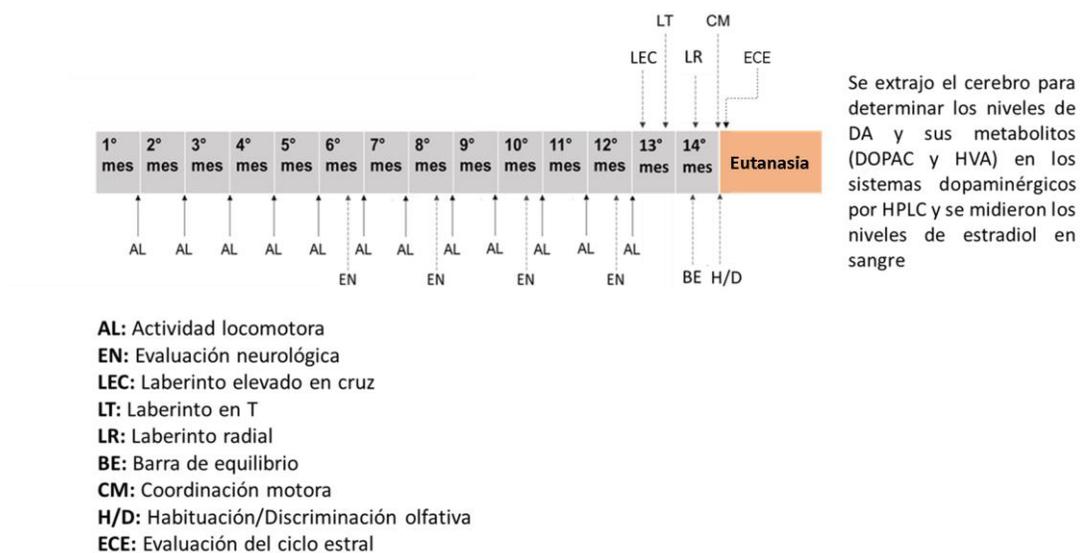


Figura 13. Diseño experimental y eventos cronológicos para el estudio de la exposición crónica a ATR durante 14 meses.

6.5 Análisis estadístico.

Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism versión 7 para el análisis de datos. Para las tareas conductuales (actividad locomotora, evaluación neurológica, laberinto elevado en cruz, laberinto en T, laberinto radial, barra de equilibrio, rodillo giratorio y habituación/discriminación olfativa) se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas de una o dos vías dependiendo el caso para cada variable y en caso de encontrar diferencias significativas se utilizó un análisis *post hoc* de Fisher. Las concentraciones de monoaminas y de estradiol en sangre, se

compararon entre grupos utilizando un ANOVA de una vía. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando el valor de p fue menor a 0.05.

VII. Resultados

7.1 Efecto de la ATR en la capacidad sensorial y motora.

No se observaron cambios importantes en el aspecto general de los sujetos y el ANOVA de una vía no arrojó efectos significativos del tratamiento sobre los parámetros sensoriales en el mes seis ($F_{(2, 32)} = 1.088$, $p = 0.3491$), ocho ($F_{(2, 32)} = 0.1006$, $p = 0.9046$), diez ($F_{(2, 32)} = 0.864$, $p = 0.4311$) y doce ($F_{(2, 32)} = 2.363$, $p = 0.1104$) (Figura 14A). En cuanto a la evaluación de los parámetros motores, no se pudo realizar una comparación estadística ya que el puntaje de todos los sujetos fue de 10 puntos, lo cual demuestra que la ATR no provocó alteraciones motoras generales (Figura 14B). Sin embargo, es importante mencionar que durante la manipulación algunas ratas del grupo expuesto a 1 mg de ATR/kg de peso se mostraron más activas que las ratas control y las expuestas a 10 mg de ATR/kg de peso ya que en algunas ocasiones buscaban escapar de la mesa donde se realizó la evaluación neurológica.

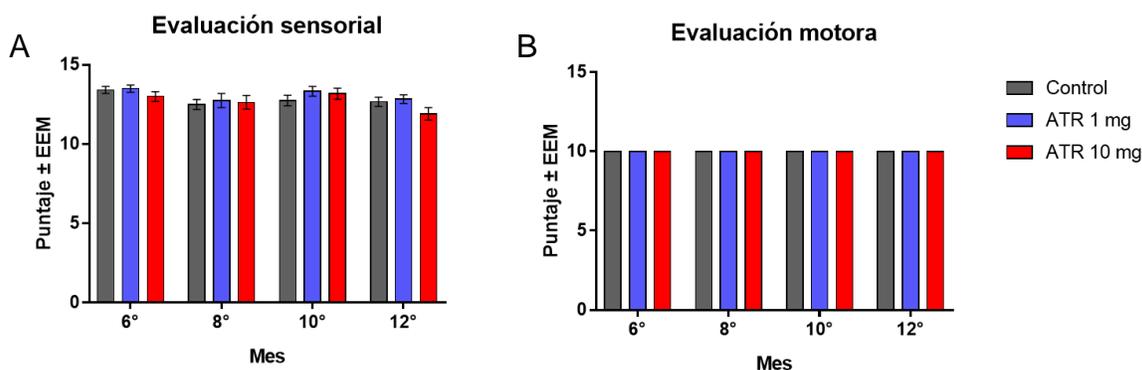


Figura 14. Evaluación neurológica. Las gráficas muestran el promedio del puntaje y el error estándar de la evaluación sensorial (A) y motora (B) de los diferentes grupos experimentales a los seis, ocho, diez y doce meses de tratamiento con el herbicida ATR.

7.2 Efecto de la ATR en la actividad locomotora.

Para evaluar el efecto de la ATR en la actividad locomotora espontánea de los roedores, mensualmente se evaluaron diferentes parámetros de actividad obtenidos

mediante un sistema de registro automatizado durante 25 horas, considerando la primera hora como el tiempo de exploración. Los resultados de las 24 horas restantes (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) se agruparon en bloques de 3 horas de actividad, tanto los resultados de la primera hora y de las 24 horas posteriores se compararon mediante un ANOVA de dos vías y medidas repetidas.

7.2.1 Efecto de la ATR en la exploración.

Para evaluar los efectos de la ATR en el proceso de exploración en la actividad locomotora se analizó la primera hora de registro utilizando el parámetro de distancia total como el parámetro que mejor representa la actividad locomotora general. El ANOVA de dos vías encontró diferencias en el factor mes ($F_{(11, 352)} = 3.997$, $p < 0.0001$), pero no en el tratamiento ($F_{(2, 32)} = 1.498$, $p = 0.2389$) ni en la interacción entre ambos factores ($F_{(22, 352)} = 0.853$, $p = 0.6578$) (Figura 15).

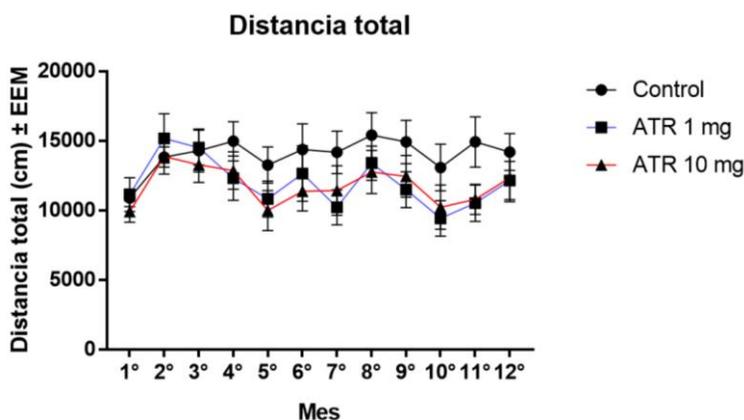


Figura 15. Actividad horizontal. La gráfica muestra el promedio y el error estándar de la distancia total recorrida en centímetros de los sujetos control, los expuestos a 1 mg de ATR/kg de peso (ATR 1 mg) y los expuestos a 10 mg de ATR/kg de peso (ATR 10 mg) cada mes durante la primera hora del registro de la actividad locomotora.

Por otro lado, al evaluar la distancia recorrida por el animal en el centro de la caja como una medida de posible ansiedad de los sujetos por estar en un espacio abierto se observaron diferencias en el factor mes ($F_{(11, 352)} = 9.316$, $p < 0.0001$), pero no en el tratamiento ($F_{(2, 32)} = 2.899$, $p = 0.1404$) ni en la interacción entre ambos factores ($F_{(22, 352)} = 0.68$, $p = 0.7522$) (Figura 16A), y al evaluar la tigmotaxis (la

tendencia de los animales a recorrer la caja tocando las paredes), también se encontraron diferencias en el factor mes ($F_{(11, 352)} = 3.995$, $p < 0.0001$) pero no en el tratamiento ($F_{(2, 32)} = 0.7431$, $p = 0.4837$) ni en la interacción ($F_{(22, 352)} = 1.032$, $p = 0.4239$) (Figura 16B).

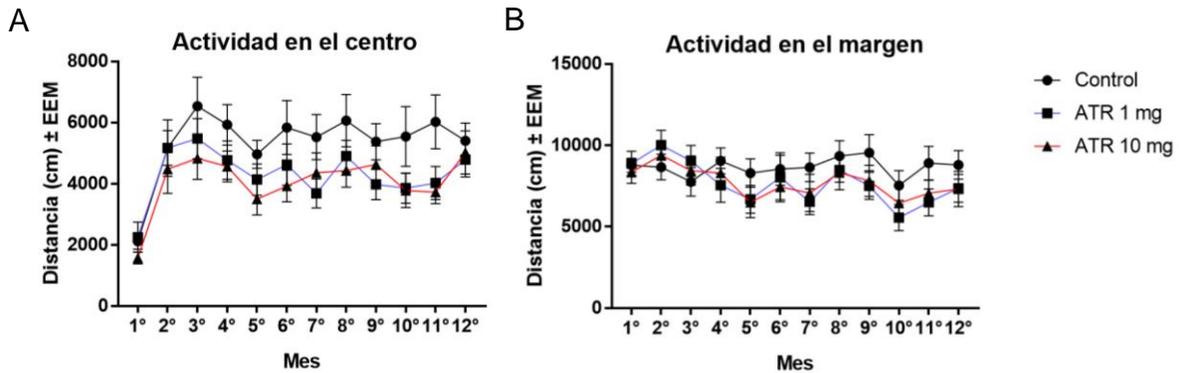


Figura 16. Actividad en el centro y el margen. La gráfica muestra el promedio y el error estándar de la distancia en centímetros de los sujetos control, los expuestos a 1 mg de ATR/kg de peso (ATR 1 mg) y los expuestos a 10 mg de ATR/kg de peso (ATR 10 mg) en (A) el centro y (B) el margen de la caja durante la primera hora de registro mensual de la actividad locomotora.

Cabe destacar que, al analizar el tiempo de actividad vertical durante la primera hora de registro, se encontraron diferencias significativas para el factor mes ($F_{(11, 352)} = 20.77$, $p < 0.0001$) y tratamiento ($F_{(2, 32)} = 4.389$, $p = 0.0207$) pero no para la interacción entre ambos factores ($F_{(22, 352)} = 0.7901$, $p = 0.7384$). La prueba post hoc arrojó diferencias significativas entre el grupo ATR 10 mg y el grupo control para el segundo ($p = 0.0030$) y tercer mes ($p = 0.0202$) (Figura 17).

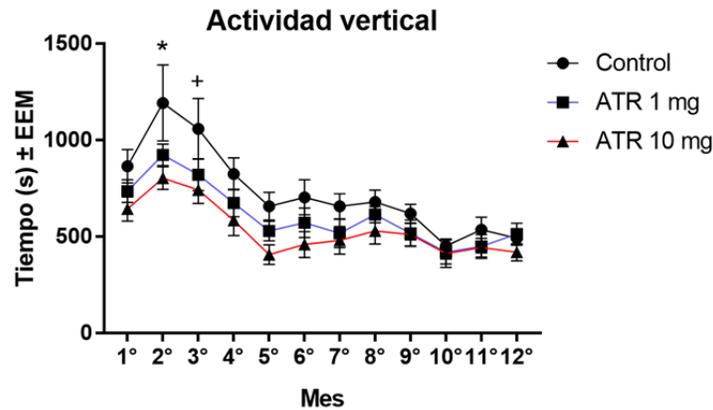


Figura 17. Actividad vertical. La gráfica muestra el promedio y error estándar del tiempo en segundos de la actividad vertical de los sujetos control, los expuestos a 1 mg de ATR/kg de peso (ATR 1 mg) y los expuestos a 10 mg de ATR/kg de peso (ATR 10 mg) durante la primera hora de registro de actividad locomotora de cada mes. * Los grupos ATR 1 mg y ATR 10 mg son estadísticamente diferentes del grupo control ($p < 0.05$), + el grupo ATR 10 mg es estadísticamente diferente del grupo control ($p < 0.05$).

7.2.2 Efecto de la ATR en la actividad locomotora espontánea general.

Como se mencionó anteriormente, los resultados de las 24 horas de registro (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) se agruparon en bloques de 3 horas de actividad y se compararon mediante un ANOVA de dos vías y medidas repetidas. En la Tabla 1 se listan los resultados del análisis de las 24 horas para el primero, segundo y séptimo mes de exposición. Se omitieron el resto de los meses al no presentar efectos significativos.

7.2.3 Efecto de la ATR en el número de movimientos.

En el parámetro de número de movimientos del primer mes se observaron diferencias significativas de tratamiento ($F_{(2, 32)} = 4.099$, $p = 0.0260$) y tiempo ($F_{(7, 224)} = 160$, $p < 0.0001$) pero no en la interacción entre ambos factores ($F_{(14, 224)} = 1.071$, $p = 0.3850$). La prueba post hoc mostró que el grupo tratado con la dosis de 1 mg de ATR/kg de peso presenta un decremento en el número de movimientos comparado con el grupo control tanto en el bloque de las 8-10 hrs ($p = 0.0247$) y el bloque de las 11-13 hrs ($p = 0.0143$), pero no con el grupo de 10 mg de ATR/kg de peso (Figura 18).

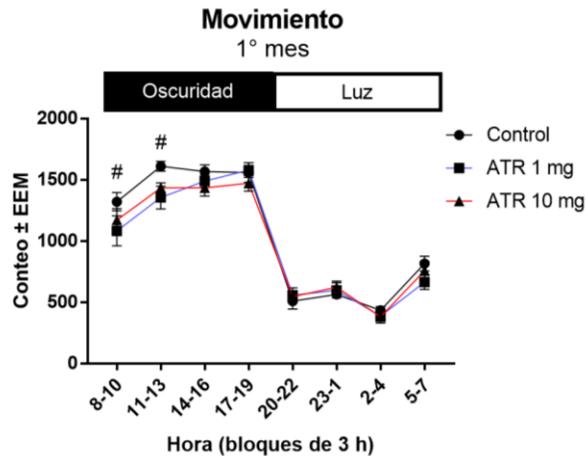


Figura 18. Efecto de la ATR en el número de movimientos. La gráfica muestra el promedio y error estándar del número de movimientos de los sujetos control, los expuestos a 1 mg de ATR/kg de peso (ATR 1 mg) y los expuestos a 10 mg de ATR/kg de peso (ATR 10 mg) en un lapso de 24 horas (divididas en bloques de 3 horas) después de un mes de tratamiento. # El grupo ATR 1 mg es estadísticamente diferente del grupo control ($p < 0.05$).

7.2.4 Efecto de la ATR en la actividad vertical

En el parámetro de actividad vertical del primer mes no se observaron diferencias significativas en el tratamiento ($F_{(2, 32)} = 2.607$, $p = 0.0893$) pero si en el tiempo ($F_{(7, 224)} = 41.05$, $p < 0.0001$) y en la interacción entre ambos factores ($F_{(14, 224)} = 2.093$, $p = 0.0131$) y en la prueba post hoc se encontró que los grupos tratados con las dosis de 1 y 10 mg de ATR/kg de peso presentan un decremento en la actividad vertical comparado con el grupo control en el bloque de las 11-13 hrs (control vs 1 mg ATR, $p = 0.0008$; control vs 10 mg ATR, $p = 0.0028$) y el bloque de las 14-16 hrs (control vs 1 mg ATR, $p = 0.0108$; control vs 10 mg ATR, $p = 0.0104$) (Figura 19A).

Por otro lado, al analizar el tiempo de actividad vertical del primer mes el estadístico arrojó diferencias significativas en el tratamiento ($F_{(2, 32)} = 3.909$, $p = 0.0303$), el tiempo ($F_{(7, 224)} = 57.33$, $p < 0.0001$) y en la interacción entre ambos factores ($F_{(14, 224)} = 2.778$, $p = 0.0008$). La prueba post hoc indicó que tanto el grupo tratado con la dosis de 1 mg como el de 10 mg de ATR/kg de peso presentan un decremento en el tiempo de actividad vertical comparado con el grupo control en el bloque de las 11-13 hrs (control vs 1 mg ATR, $p = 0.0001$; control vs 10 mg ATR, $p < 0.0001$) y el bloque de las 14-16 hrs (control vs 1 mg ATR, $p = 0.0395$; control vs 10 mg

ATR, $p = 0.0023$), mientras que para el bloque de las 17-19 hrs solo el grupo de 10 mg de ATR fue estadísticamente diferente con respecto al grupo control ($p = 0.0469$) (Figura 19B).

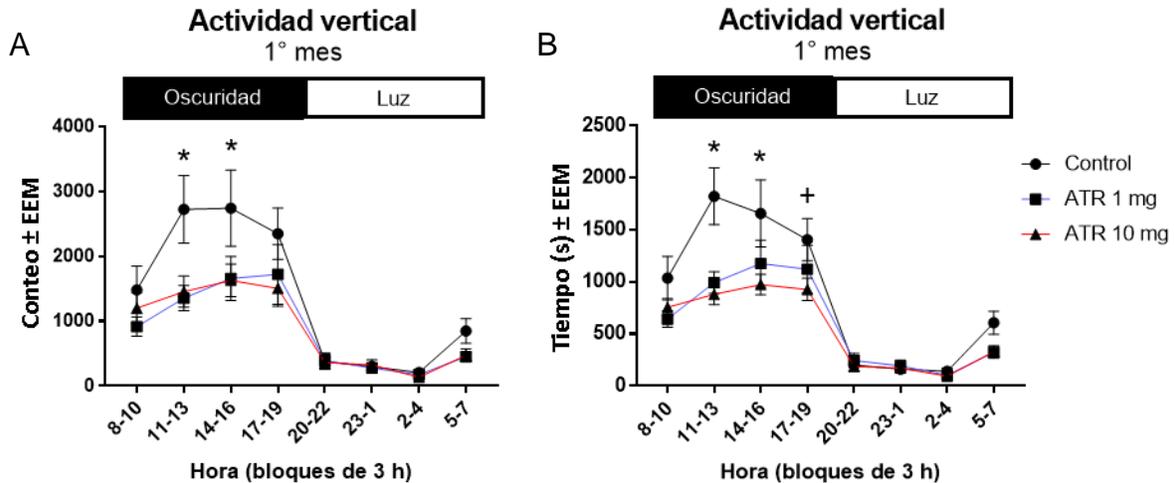


Figura 19. Efecto de la ATR en la actividad vertical. La gráfica muestra el promedio y error estándar de (A) el conteo de la actividad vertical y (B) el tiempo de actividad vertical de los sujetos control, los expuestos a 1 mg de ATR/kg de peso (ATR 1 mg) y los expuestos a 10 mg de ATR/kg de peso (ATR 10 mg) en un lapso de 24 horas (divididas en bloques de 3 horas) después de un mes de tratamiento. * Los grupos ATR 1 mg y ATR 10 mg son estadísticamente diferentes del grupo control ($p < 0.05$); + el grupo ATR 10 mg es estadísticamente diferente del grupo control ($p < 0.05$).

7.2.5 Efecto de la ATR en las estereotipias

En el parámetro de actividad estereotípica del primer mes se encontraron diferencias significativas en el tratamiento ($F_{(2, 32)} = 4.927$, $p = 0.0136$) y el tiempo ($F_{(7, 224)} = 119.4$, $p < 0.0001$) pero no en la interacción entre ambos factores ($F_{(14, 224)} = 0.6549$, $p = 0.8164$). La prueba post hoc arrojó que el grupo tratado con la dosis de 10 mg de ATR presenta un decremento en la actividad estereotípica comparado con el grupo tratado con 1 mg de ATR en el bloque de las 17-19 hrs ($p = 0.0499$) pero no con el grupo control ($p = 0.0913$) (Figura 20A).

De manera similar, al analizar la actividad estereotípica del segundo mes, nuevamente se encontraron diferencias significativas en el tratamiento ($F_{(2, 32)} = 3.414$, $p = 0.0453$) y el tiempo ($F_{(7, 224)} = 52.16$, $p < 0.0001$) pero no en la interacción entre ambos factores ($F_{(14, 224)} = 0.6571$, $p = 0.8144$). La prueba post hoc indicó que

el grupo tratado con la dosis de 10 mg de ATR presenta un decremento en la actividad estereotípica comparado con el grupo control en el bloque de las 8-10 hrs ($p = 0.0500$) pero no con el grupo de 1 mg de ATR/kg de peso ($p = 0.5674$) (Figura 20B).

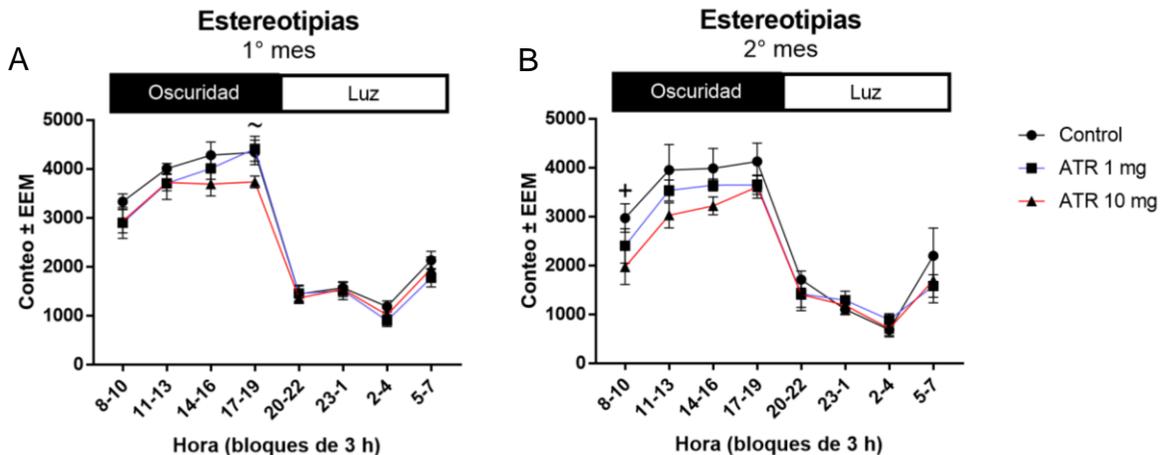


Figura 20. Efecto de la ATR en la actividad estereotípica. La gráfica muestra el promedio y error estándar del conteo de la actividad estereotípica de los sujetos control, los expuestos a 1 mg de ATR/kg de peso (ATR 1 mg) y los expuestos a 10 mg de ATR/kg de peso (ATR 10 mg) en un lapso de 24 horas (divididas en bloques de 3 horas) después de (A) un mes y (B) dos meses de tratamiento. ~ el grupo ATR 10 mg es estadísticamente diferente del grupo de ATR 1 mg ($p < 0.05$); + El grupo ATR 10 mg es estadísticamente diferente del grupo control ($p < 0.05$).

7.2.6 Efecto de la ATR en el descanso

Al analizar los episodios de descanso del primer mes el análisis mostró diferencias significativas en el tratamiento ($F_{(2, 32)} = 4.068$ $p = 0.0267$) y el tiempo ($F_{(7, 224)} = 160$ $p < 0.0001$) pero no en la interacción entre ambos factores ($F_{(14, 224)} = 1.073$ $p = 0.3830$). La prueba post hoc reveló que el grupo tratado con la dosis de 1 mg de ATR presenta un decremento significativo en los episodios de descanso comparado con el grupo control tanto en el bloque de las 8-10 hrs ($p = 0.0246$) como el bloque de las 11-13 hrs ($p = 0.0142$), pero no es diferente con respecto al grupo de 10 mg (8-10 hrs: $p = 0.6101$; 11-13 hrs: $p = 0.06634$) (Figura 21A).

Y en el séptimo mes el ANOVA también encontró diferencias significativas en el tratamiento ($F_{(2, 32)} = 4.694$, $p = 0.0163$) y el tiempo ($F_{(7, 224)} = 42.37$, $p < 0.0001$) pero no en la interacción entre ambos factores ($F_{(14, 224)} = 0.8568$, $p = 0.6067$). La

prueba post hoc mostró que el grupo tratado con la dosis de 10 mg de ATR/kg de peso presentan un aumento significativo en los episodios de descanso comparado con el grupo control en el bloque de las 14-16 hrs ($p = 0.0206$), pero no con el grupo de 1 mg ($p = 0.2032$) (Figura 21B).

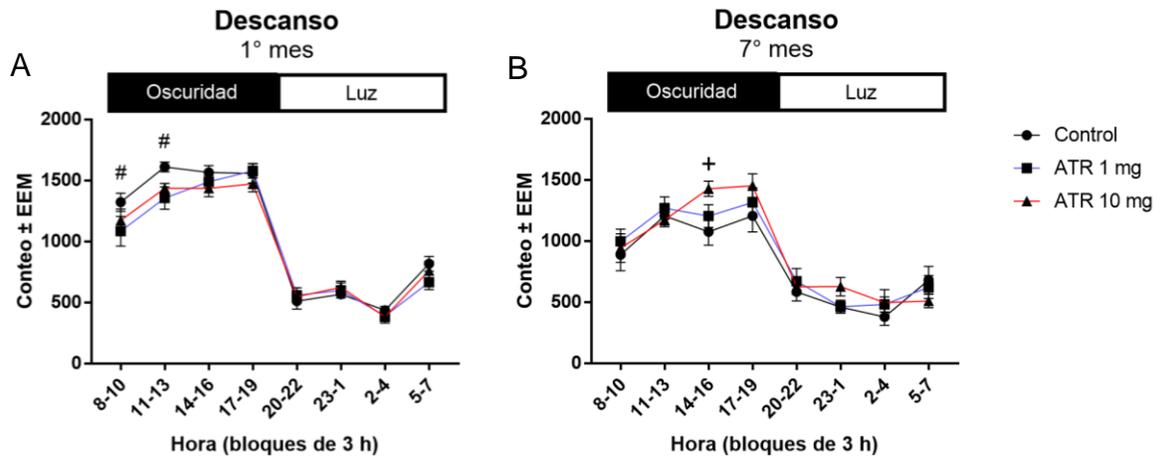


Figura 21. Efecto de la ATR en el descanso. La gráfica muestra el promedio y error estándar del conteo del descanso de los sujetos control, los expuestos a 1 mg de ATR/kg de peso (ATR 1 mg) y los expuestos a 10 mg de ATR/kg de peso (ATR 10 mg) en un lapso de 24 horas (divididas en bloques de 3 horas) después de (A) un mes y (B) siete meses de tratamiento. # el grupo ATR 1 mg es estadísticamente diferente del grupo control ($p < 0.05$). + El grupo ATR 10 mg es estadísticamente diferente del grupo control ($p < 0.05$).

Tabla de F's										
Primer mes (24 hrs)										
Grupo	AH	DT	NM	TM	AV	TV	CE	TE	AA	ED
Grupo	$F_{(2, 32)} = 2.2$	$F_{(2, 32)} = 0.3$	$F_{(2, 32)} = 4.0^*$	$F_{(2, 32)} = 2.1$	$F_{(2, 32)} = 2.6$	$F_{(2, 32)} = 3.9^*$	$F_{(2, 32)} = 4.9^*$	$F_{(2, 32)} = 4.9^*$	$F_{(2, 32)} = 1.8$	$F_{(2, 32)} = 4.0^*$
Tiempo	$F_{(7, 224)} = 120.2^*$	$F_{(7, 224)} = 63.3^*$	$F_{(7, 224)} = 160^*$	$F_{(7, 224)} = 133.9^*$	$F_{(7, 224)} = 41.0^*$	$F_{(7, 224)} = 57.3^*$	$F_{(7, 224)} = 119.4^*$	$F_{(7, 224)} = 82.8^*$	$F_{(7, 224)} = 111.1^*$	$F_{(7, 224)} = 1^*$
Interacción	$F_{(14, 224)} = 0.7$	$F_{(14, 224)} = 0.9$	$F_{(14, 224)} = 1.0$	$F_{(14, 224)} = 0.5$	$F_{(14, 224)} = 2.0^*$	$F_{(14, 224)} = 2.7^*$	$F_{(14, 224)} = 0.6$	$F_{(14, 224)} = 0.6$	$F_{(14, 224)} = 0.8$	$F_{(14, 224)} = 1.0$

Tabla de F's										
Segundo mes (24 hrs)										
Grupo	AH	DT	NM	TM	AV	TV	CE	TE	AA	ED
Grupo	$F_{(2, 32)} = 0.5$	$F_{(2, 32)} = 0.06$	$F_{(2, 32)} = 1.5$	$F_{(2, 32)} = 0.9$	$F_{(2, 32)} = 0.7$	$F_{(2, 32)} = 0.9$	$F_{(2, 32)} = 3.4^*$	$F_{(2, 32)} = 2.9$	$F_{(2, 32)} = 0.4$	$F_{(2, 32)} = 1.5$
Tiempo	$F_{(7, 224)} = 82.5^*$	$F_{(7, 224)} = 51.4^*$	$F_{(7, 224)} = 123.5^*$	$F_{(7, 224)} = 90^*$	$F_{(7, 224)} = 4.6^*$	$F_{(7, 224)} = 35.0^*$	$F_{(7, 224)} = 52.1^*$	$F_{(7, 224)} = 60.4^*$	$F_{(7, 224)} = 77.2^*$	$F_{(7, 224)} = 123.5^*$
Interacción	$F_{(14, 224)} = 0.8$	$F_{(14, 224)} = 0.5$	$F_{(14, 224)} = 0.8$	$F_{(14, 224)} = 0.9$	$F_{(14, 224)} = 1.0$	$F_{(14, 224)} = 0.8$	$F_{(14, 224)} = 0.6$	$F_{(14, 224)} = 0.8$	$F_{(14, 224)} = 0.8$	$F_{(14, 224)} = 0.8$

Tabla de F's										
Séptimo mes (24 hrs)										
Grupo	AH	DT	NM	TM	AV	TV	CE	TE	AA	ED
Grupo	$F_{(2, 32)} = 0.1$	$F_{(2, 32)} = 0.1$	$F_{(2, 32)} = 1.8$	$F_{(2, 32)} = 0.1$	$F_{(2, 32)} = 0.1$	$F_{(2, 32)} = 0.6$	$F_{(2, 32)} = 0.7$	$F_{(2, 32)} = 1.8$	$F_{(2, 32)} = 0.1$	$F_{(2, 32)} = 4.6^*$
Tiempo	$F_{(7, 224)} = 21.3^*$	$F_{(7, 224)} = 14.0^*$	$F_{(7, 224)} = 29.7^*$	$F_{(7, 224)} = 25.9^*$	$F_{(7, 224)} = 16.2^*$	$F_{(7, 224)} = 19.8^*$	$F_{(7, 224)} = 25.9^*$	$F_{(7, 224)} = 29.7^*$	$F_{(7, 224)} = 19.8^*$	$F_{(7, 224)} = 42.3^*$
Interacción	$F_{(14, 224)} = 0.5$	$F_{(14, 224)} = 0.4$	$F_{(14, 224)} = 0.3$	$F_{(14, 224)} = 0.4$	$F_{(14, 224)} = 0.8$	$F_{(14, 224)} = 0.8$	$F_{(14, 224)} = 0.4$	$F_{(14, 224)} = 0.3$	$F_{(14, 224)} = 0.5$	$F_{(14, 224)} = 0.8$

Tabla 1. Resumen de los valores de F para el análisis de las 24 horas del registro de la actividad locomotora espontánea en el primero, segundo y séptimo mes de exposición. Abreviaciones. AH, actividad horizontal; DT, distancia total; NM, numero de movimientos; TM, tiempo en movimiento; AV, actividad vertical; TV, tiempo vertical; CE, cuentas de estereotipias; TE, tiempo en estereotipias; AA, actividad ambulatoria; ED, episodios de descanso. * $p < 0.05$

7.3 Efecto de la ATR en la ansiedad

7.3.1 Laberinto elevado en cruz

Al evaluar la ansiedad de los sujetos midiendo el tiempo que pasan en los brazos del laberinto elevado en cruz no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales para el tiempo que los animales pasaron en los brazos abiertos ($F_{(2, 31)} = 0.003$, $p = 0.996$) o cerrados ($F_{(2, 31)} = 0.4253$, $p = 0.657$) (Figura 22).

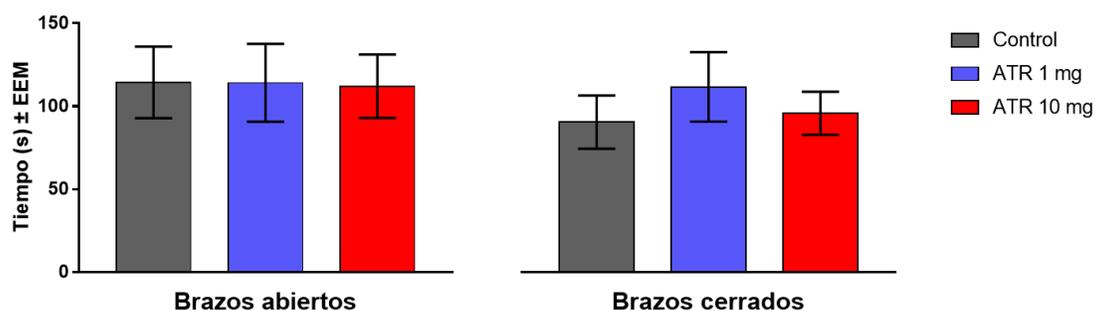


Figura 22. Efecto de la ATR en la ansiedad. La gráfica muestra el promedio y el error estándar del tiempo en los brazos abiertos y cerrados del laberinto elevado en cruz de los sujetos control, los expuestos a 1 mg de ATR/kg de peso (ATR 1 mg) y los expuestos a 10 mg de ATR/kg de peso (ATR 10 mg) a los 13 meses de tratamiento.

7.4 Efecto de la ATR sobre tareas de aprendizaje y memoria

7.4.1 Laberinto en T alternancia espontánea

Al comparar el promedio del porcentaje de alternancia de los sujetos durante los 10 ensayos consecutivos del primer día de entrenamiento no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales ($F_{(2, 27)} = 0.7614$, $p = 0.4768$) (Figura 23).

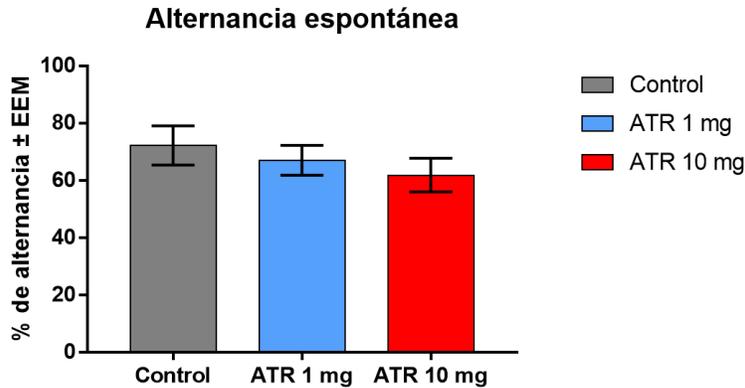


Figura 23. Efecto de la ATR en la alternancia espontánea. La gráfica muestra el promedio y el error estándar del porcentaje de alternancia de los sujetos control, los expuestos a 1 mg de ATR/kg de peso (ATR 1 mg) y los expuestos a 10 mg de ATR/kg de peso (ATR 10 mg) durante 10 ensayos consecutivos el primer día de entrenamiento.

De manera similar, al comparar el número de errores a lo largo de los 5 días de entrenamiento se encontraron efectos significativos para el factor día ($F_{(4, 108)} = 14.43, p < 0.0001$), pero no para el tratamiento ($F_{(2, 27)} = 0.179, p = 0.836$) o la interacción entre ambos factores ($F_{(8, 108)} = 0.8678, p = 0.5461$) (Figura 24A).

Y al evaluar el tiempo que los sujetos tardan en obtener el reforzador a lo largo de los días también encontramos diferencias significativas para el factor día ($F_{(4, 108)} = 14.28, p < 0.0001$) pero no para el tratamiento ($F_{(2, 27)} = 0.1969, p = 0.8225$) ni la interacción entre ambos factores ($F_{(8, 108)} = 1.432, p = 0.1913$) (Figura 24B).

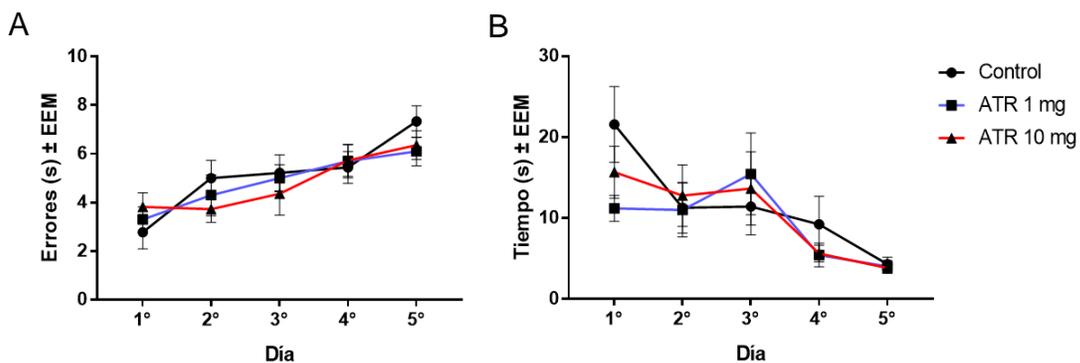


Figura 24. Efecto de la ATR en la alternancia espontánea. Las gráficas muestran el promedio y el error estándar de los errores cometidos (A) y el tiempo (B) que le tomó a los sujetos control, los expuestos a 1 mg de ATR/kg de peso (ATR 1 mg) y los expuestos a 10 mg de ATR/kg de peso (ATR

10 mg) obtener el reforzador durante 5 sesiones de entrenamiento en la tarea de alternancia espontánea realizada en el mes 13 de tratamiento.

7.4.2 Laberinto en T alternancia forzada

Al evaluar el aprendizaje de tipo egocéntrico se encontraron diferencias en el número de errores de los sujetos para el factor día ($F_{(4, 108)} = 34.6, p < 0.0001$) pero no para el tratamiento ($F_{(2, 27)} = 0.1648, p = 0.8489$) o la interacción entre ambos factores ($F_{(8, 108)} = 0.5495, p = 0.8167$) (Figura 25A). De igual manera, al evaluar el tiempo también encontramos diferencias significativas para el factor día ($F_{(4, 108)} = 4.011, p = 0.0045$) pero no para el tratamiento ($F_{(2, 27)} = 0.3978, p = 0.6757$) ni la interacción entre ambos factores ($F_{(8, 108)} = 1.061, p = 0.3958$) (Figura 25B).

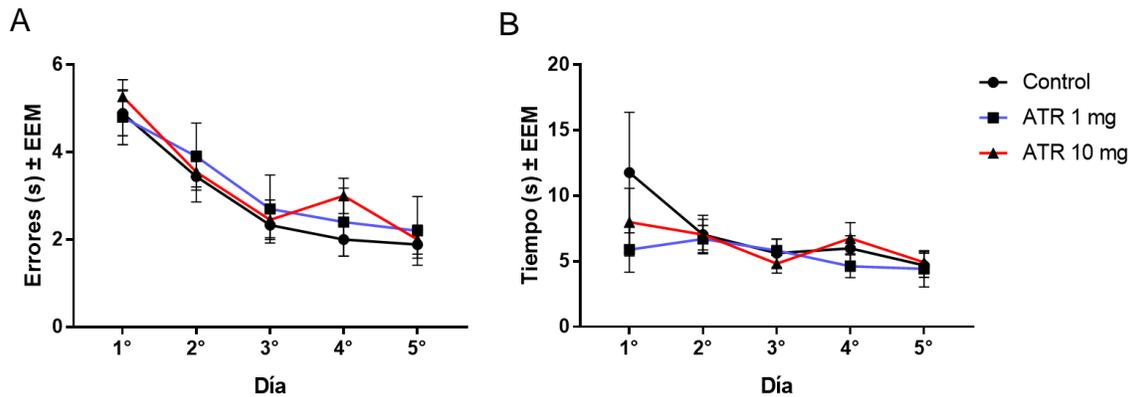


Figura 25. Efecto de la ATR en la alternancia espontánea. Las gráficas muestran el promedio y el error estándar de los errores cometidos (A) y el tiempo (B) que le tomo a los sujetos control, los expuestos a 1 mg de ATR/kg de peso (ATR 1 mg) y los expuestos a 10 mg de ATR/kg de peso (ATR 10 mg) obtener el reforzador durante 5 sesiones de entrenamiento en la tarea de alternancia forzada realizada en el mes 13 de tratamiento.

7.4.3 Laberinto radial gana y cambia

Para evaluar la memoria espacial de los sujetos y posibles afecciones en la funcionalidad del hipocampo se realizó un entrenamiento en dos versiones distintas de la tarea de laberinto radial de 8 brazos. En la versión *gana y cambia* no se encontraron diferencias significativas en el número de errores cometidos por los sujetos durante 5 días consecutivos de entrenamiento para el factor día ($F_{(4, 108)} = 1.852, p = 0.1242$), tratamiento ($F_{(2, 27)} = 0.2721, p = 0.7638$) o la interacción entre

ambos factores ($F_{(8, 108)} = 0.719, p = 0.6743$) (Figura 26A). Y al comparar los tiempos que los sujetos tardaron en resolver la tarea encontramos diferencias significativas para el factor día ($F_{(4, 108)} = 7.745, p < 0.0001$) pero no para el tratamiento ($F_{(2, 27)} = 0.6781, p = 0.5160$) o la interacción ($F_{(8, 108)} = 0.692, p = 0.6978$) (Figura 26B).

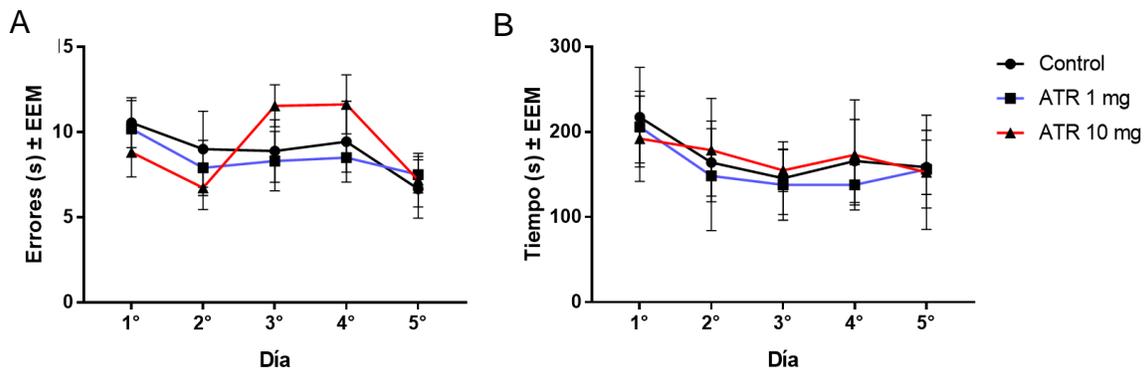


Figura 26. Efecto de la ATR en el aprendizaje y memoria espacial. Las gráficas muestran el promedio y el error estándar de los errores cometidos (A) y el tiempo (B) que le tomó a los sujetos control, los expuestos a 1 mg de ATR/kg de peso (ATR 1 mg) y los expuestos a 10 mg de ATR/kg de peso (ATR 10 mg) obtener el reforzador durante 5 sesiones de entrenamiento en la tarea de gana y cambia realizada en el mes 13 de tratamiento.

7.4.4 Laberinto radial gana y cambia con retardo

Por otro lado, al analizar los errores de la versión de *gana y cambia con retardo* (a la cual también se le ha atribuido la participación de NAc) tampoco se encontraron diferencias significativas para el factor día ($F_{(4, 108)} = 2.277, p = 0.0656$), para el factor tratamiento ($F_{(2, 27)} = 0.3602, p = 0.7008$) o la interacción entre ambos factores ($F_{(8, 108)} = 1.053, p = 0.4017$) (Figura 27A). Sin embargo, al comparar el tiempo que los sujetos tardaron en obtener los reforzadores encontramos diferencias para el factor día ($F_{(4, 108)} = 0.7258, p = 0.5762$) pero no para el tratamiento ($F_{(2, 27)} = 0.3173, p = 0.7308$) o la interacción entre ambos factores ($F_{(8, 108)} = 0.5387, p = 0.8250$) (Figura 27B).

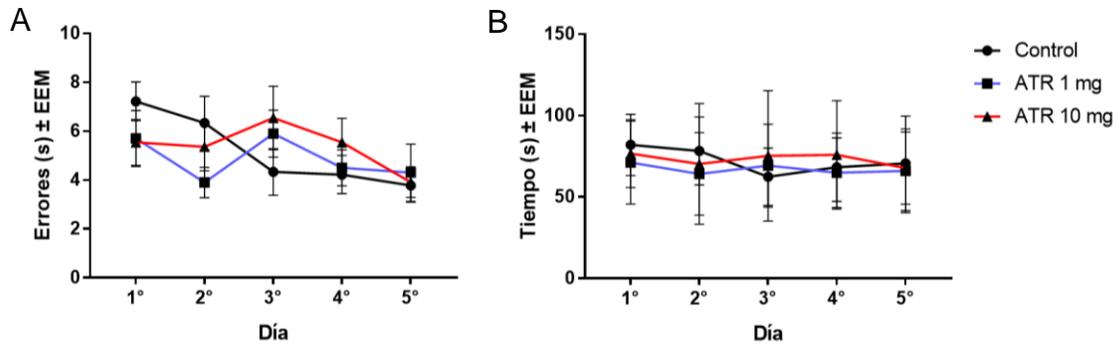


Figura 27. Efecto de la ATR en el aprendizaje y memoria espacial. Las gráficas muestran el promedio y el error estándar de los errores cometidos (A) y el tiempo (B) que le tomó a los sujetos control, los expuestos a 1 mg de ATR/kg de peso (ATR 1 mg) y los expuestos a 10 mg de ATR/kg de peso (ATR 10 mg) obtener el reforzador durante 5 sesiones de entrenamiento en la tarea de gana y cambia con retardo realizada en el mes 13 de tratamiento.

7.5 Efecto de la ATR en la coordinación motora

7.5.1 Barra de equilibrio

Al evaluar la coordinación motora fina mediante la tarea de la barra de equilibrio tampoco se encontraron diferencias significativas en el tiempo que los sujetos tardaron en recorrer la viga ($F_{(2, 27)} = 0.3684$, $p = 0.6953$) ni en los errores que cometieron durante el trayecto ($F_{(2, 27)} = 1.007$, $p = 0.3788$) (Tabla 2).

	Control	ATR 1 mg	ATR 10 mg	Estadística
Tiempo total (segundos)	48 ± 6.6	45 ± 7	40.27 ± 5.6	$F_{(2, 27)} = 0.3684$ $p = 0.6953$
Errores totales	2.222 ± 0.2	2.4 ± 0.2	2.818 ± 0.4	$F_{(2, 27)} = 1.007$ $p = 0.3788$

Tabla 2. La tabla muestra la media ± el error estándar del tiempo en recorrer la viga y los errores cometidos de los sujetos control, los expuestos a 1 mg de ATR/kg de peso (ATR 1 mg) y los expuestos a 10 mg de ATR/kg de peso (ATR 10 mg) a los 13 meses de tratamiento.

7.5.2 Cilindro giratorio

Se evaluó la coordinación motora gruesa de los sujetos al comparar el tiempo que los sujetos de los diferentes grupos experimentales permanecen en el cilindro giratorio en la prueba del rotorod durante 5 días consecutivos. Se observaron

diferencias significativas para el factor día ($F_{(4, 108)} = 11.05, p < 0.0001$) pero no para el tratamiento ($F_{(2, 27)} = 0.1508, p = 0.8607$) o en la interacción entre ambos factores ($F_{(8, 108)} = 0.955, p = 0.4751$) (Figura 28).

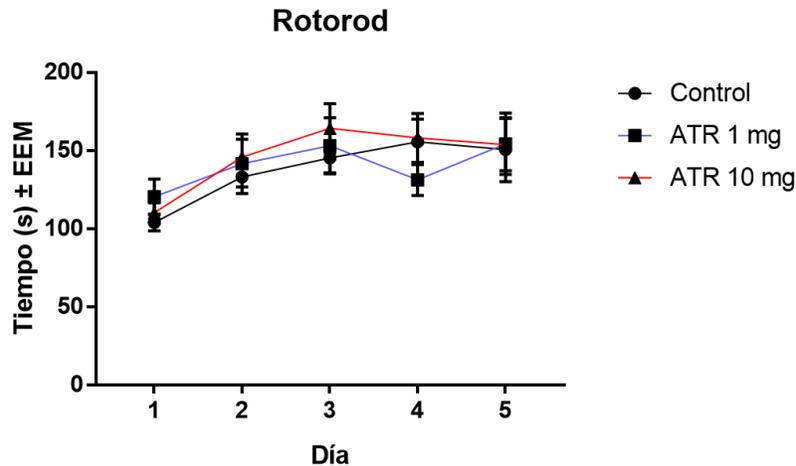


Figura 28. Efecto de la ATR en la coordinación motora. La gráfica muestra el promedio y el error estándar del tiempo que los sujetos control, los expuestos a 1 mg de ATR/kg de peso (ATR 1 mg) y los expuestos a 10 mg de ATR/kg de peso (ATR 10 mg) permanecieron en el cilindro giratorio durante 5 sesiones de entrenamiento en la prueba de rotorod evaluada en el mes 14 de tratamiento.

7.6 Efecto de la ATR en la habituación/discriminación olfativa

7.6.1 Capacidad de habituación a olores novedosos sociales y no sociales

Al evaluar la capacidad olfatoria de los sujetos mediante el tiempo de olfacción de los estímulos a lo largo de los ensayos se encontraron diferencias para el factor tiempo ($F_{(13, 351)} = 16.72, p < 0.0001$), pero no en el tratamiento ($F_{(2, 27)} = 2.059, p = 0.1471$) ni en la interacción entre ambos factores ($F_{(26, 351)} = 1.077, p = 0.3653$) (Figura 29).

Al evaluar el tiempo de olfacción de cada ensayo por parte de cada uno de los grupos experimentales se observó que los sujetos del grupo control lograron habituarse a los olores probados como lo indica la disminución en el tiempo de olfateo durante la presentación consecutiva del olor a vainilla ($F_{(2, 16)} = 16.36, p = 0.0001$), a plátano ($F_{(2, 16)} = 36.29, p < 0.0001$), a macho ($F_{(2, 16)} = 15.08, p = 0.0002$) y a hembra ($F_{(2, 16)} = 7.471, p = 0.0051$) (Figura 29).

Por otro lado, los sujetos expuestos a 1 mg de ATR no mostraron una disminución en el tiempo de olfateo al olor de vainilla ($F_{(2, 18)} = 0.312, p = 0.7358$) pero si para el olor a plátano ($F_{(2, 18)} = 10.38, p = 0.0010$) y a macho ($F_{(2, 18)} = 5.254, p = 0.0160$), sin embargo, el tiempo de exploración para el olor a hembra tampoco disminuyó ($F_{(9, 18)} = 1.257, p = 0.3082$) (Figura 29).

Y en cuanto al grupo expuesto a 10 mg de ATR se observó que los sujetos se habituaron al olor de vainilla ($F_{(2, 20)} = 8.949, p = 0.0017$), plátano ($F_{(2, 20)} = 18.86, p = 0.0001$), macho ($F_{(2, 20)} = 8.616, p = 0.0020$) y hembra ($F_{(2, 20)} = 5.074, p = 0.0165$), sin embargo, vale la pena destacar que para el olor a macho hubo una disminución en el tiempo de exploración de la segunda presentación con respecto a la primera pero no de la tercera presentación con respecto a la primera ($p = 0.0622$) (Figura 29).

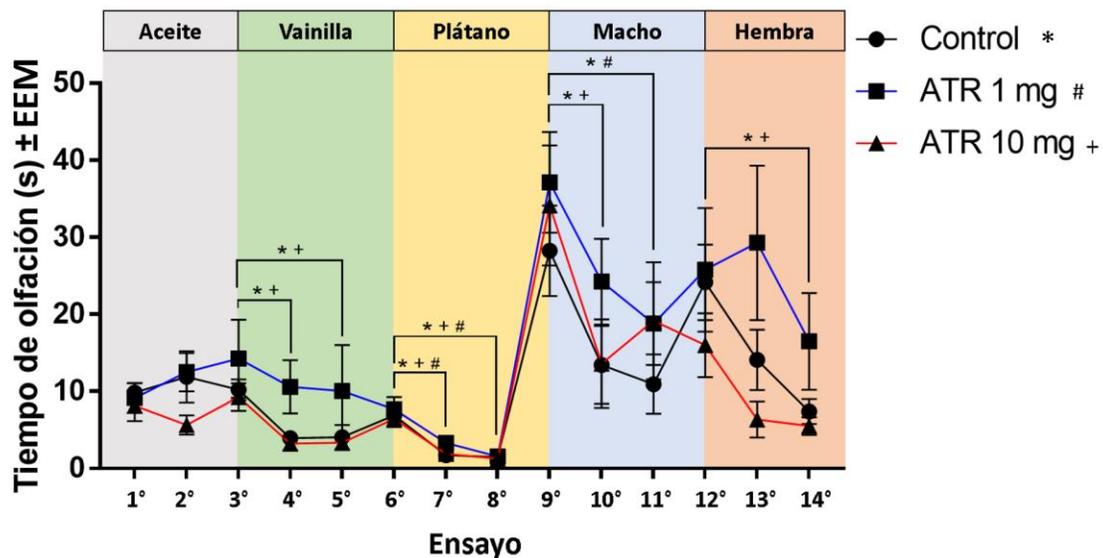


Figura 29. Efecto de la ATR en la habituación olfativa. La gráfica muestra el promedio y el error estándar del tiempo de exploración o tiempo de olfateo de presentaciones consecutivas de olor a aceite mineral (gris), a vainilla (verde), a plátano (amarillo), a macho (azul) y a hembra (rosa) de los sujetos control, los expuestos a 1 mg de ATR/kg de peso (ATR 1 mg) y los expuestos a 10 mg de ATR/kg de peso (ATR 10 mg). El tiempo de exploración es estadísticamente significativo ($p < 0.05$) con respecto al tiempo de exploración de la primera presentación para cada olor en el grupo * Control, # 1 mg y + 10 mg.

7.6.2 Capacidad de deshabitación o discriminación de olores novedosos sociales y no sociales.

Al evaluar la deshabitación que se entiende como un incremento en el tiempo de exploración hacia un nuevo olor, lo que permite decir que hay discriminación de un olor, se encontraron diferencias significativas para el factor tiempo ($F_{(8, 216)} = 19.77$, $p < 0.0001$), pero no en el tratamiento ($F_{(2, 27)} = 1.209$, $p = 0.3142$) ni en la interacción entre ambos factores ($F_{(16, 216)} = 0.6786$, $p = 0.8136$) (Figura 30).

Al comparar el tiempo de olfacción de cada grupo experimental se observaron diferencias significativas en el grupo control ($F_{(7, 56)} = 11.37$, $p < 0.0001$), específicamente entre la primera presentación del olor a macho con respecto a la última presentación de olor a plátano ($p = 0.0017$) y entre la primera presentación del olor a hembra con respecto a la última presentación del olor a macho ($p = 0.0073$) (Figura 30).

En cuanto al grupo expuesto a 1 mg de ATR también se encontraron diferencias significativas ($F_{(7, 63)} = 6.019$, $p < 0.0001$) pero solo se observó deshabitación para el primer ensayo del olor a macho con respecto al último ensayo del olor a plátano ($p = 0.0004$) (Figura 30).

Y en el grupo expuesto a 10 mg de ATR también se encontraron diferencias significativas ($F_{(7, 70)} = 8.826$, $p < 0.0023$), en este caso para la primera presentación del olor a plátano con respecto a la última presentación del olor a vainilla ($p = 0.0210$) y para la primera presentación del olor a macho con respecto a la última presentación de olor a plátano ($p = 0.0015$) (Figura 30).

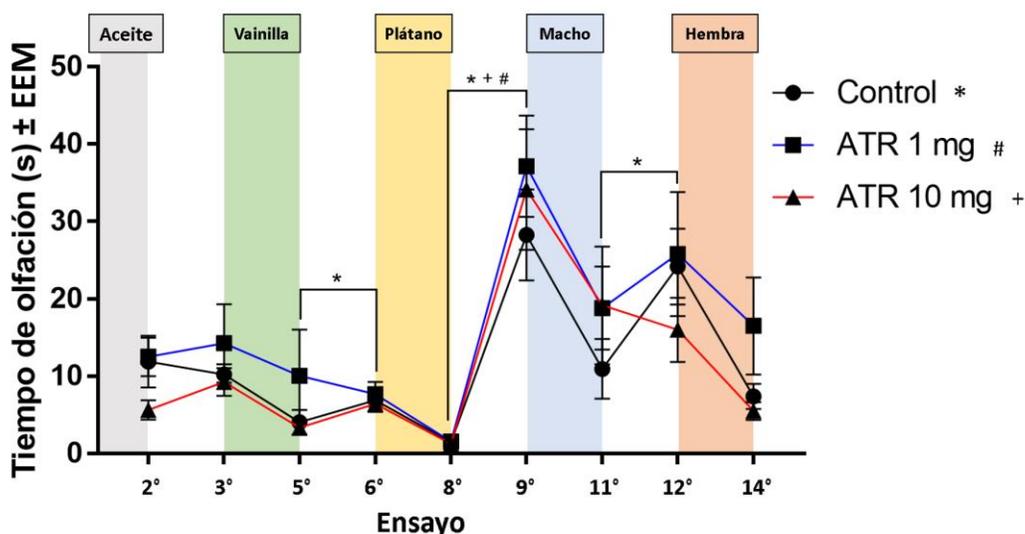


Figura 30. Efecto de la ATR en la discriminación olfativa. La gráfica muestra el promedio y el error estándar del tiempo de exploración de la primera y la última presentación del olor a aceite mineral (gris), a vainilla (verde), a plátano (amarillo), a macho (azul) y a hembra (rosa) de los sujetos control, los expuestos a 1 mg de ATR/kg de peso (ATR 1 mg) y los expuestos a 10 mg de ATR/kg de peso (ATR 10 mg). El tiempo de exploración del estímulo es estadísticamente significativo ($p < 0.05$) con respecto al tiempo de exploración del estímulo anterior en el grupo * Control, # 1 mg y + 10 mg.

Se promedió el tiempo de exploración de los tres ensayos por cada estímulo olfativo y se comparó entre los diferentes grupos experimentales. De manera general, no se encontraron diferencias en el tiempo que los sujetos de los diferentes grupos exploraron los olores no sociales (vainilla, $F_{(2, 27)} = 2.377$, $p = 0.1119$; plátano, $F_{(2, 27)} = 0.6026$, $p = 0.5546$) (Figura 20A) y sociales (macho, $F_{(2, 27)} = 0.6998$, $p = 0.5055$; hembra, $F_{(2, 27)} = 3.223$, $p = 0.0555$) (Figura 20B). Sin embargo, al comparar el tiempo que los sujetos de cada grupo experimental olfatearon cada uno de los olores no sociales y sociales encontramos que en los olores no sociales solo el grupo control olfateó significativamente menos tiempo el olor a plátano comparado con el olor a vainilla ($p = 0.0324$) (Figura 31A).

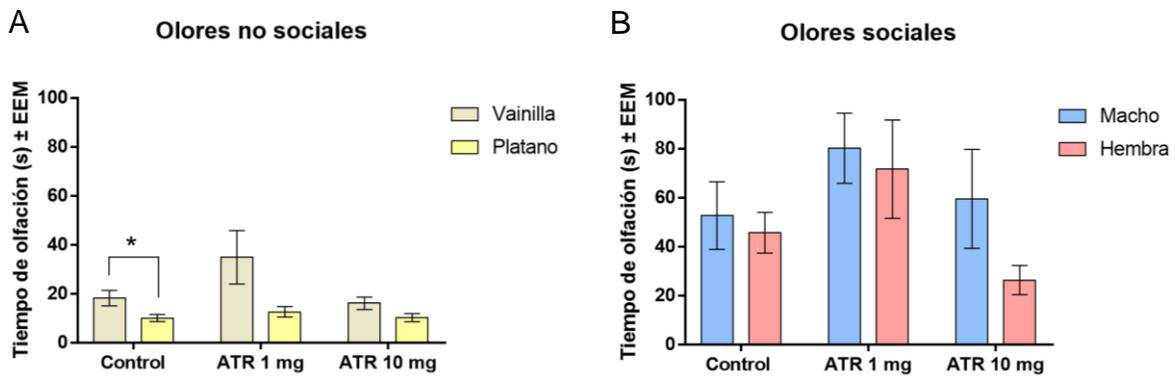


Figura 31. Efecto de la ATR en el tiempo de olfacción total. Las gráficas muestran el promedio y el error estándar del tiempo total de olfacción de los olores A) no sociales y B) sociales por parte de los sujetos control, los expuestos a 1 mg de ATR/kg de peso (ATR 1 mg) y los expuestos a 10 mg de ATR/kg de peso (ATR 10 mg). * diferencias estadísticamente significativas

Por último y de manera similar, al promediar el tiempo de olfacción de los olores no sociales y sociales no encontramos diferencias entre grupos experimentales (No sociales, $F_{(2, 27)} = 2.326$, $p = 0.1169$; Sociales, $F_{(2, 27)} = 1.774$, $p = 0.1889$). Sin embargo, al comparar el tiempo que cada grupo exploró los olores no sociales y sociales encontramos que en todos ellos los sujetos exploraron significativamente más tiempo los olores sociales (Control, $p = 0.0044$; ATR 1 mg, $p = 0.0069$; ATR 10 mg, $p = 0.0278$) (Figura 32).

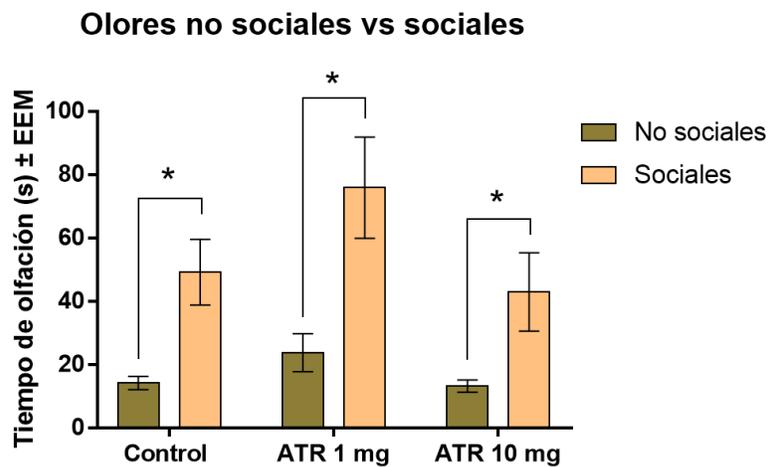


Figura 32. Efecto de la ATR en el tiempo de olfacción de los olores no sociales y sociales. Las gráficas muestran el promedio y el error estándar del tiempo total de olfacción de los olores no sociales y sociales por parte de los sujetos control, los expuestos a 1 mg de ATR/kg de peso (ATR

1 mg) y los expuestos a 10 mg de ATR/kg de peso (ATR 10 mg). * diferencias estadísticamente significativas

7.7 Efecto de la ATR en los niveles de monoaminas

Inmediatamente después de la eutanasia se evaluó el ciclo estral de las ratas hembra encontrando que la gran mayoría de ellas se encontraba en la etapa de diestro (Tabla 3). Además, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de estradiol en sangre ($F_{(2, 18)} = 0.06435$, $p = 0.9379$) (Figura 33) con lo cual podemos descartar posibles influencias de las hormonas sexuales femeninas producto de cada fase estral en los niveles de monoaminas en las diferentes regiones cerebrales analizadas.

	CONTROL	ATR 1 MG	ATR 10 MG
1	Metaestro	Diestro	Metaestro
2	Diestro	Diestro	Diestro
3	Diestro	Metaestro	Diestro
4	Diestro	Diestro	Diestro
5	Diestro	Metaestro	Diestro
6	Diestro	Diestro	Metaestro
7	Diestro	Metaestro/diestro	Diestro
8	Diestro	Diestro	Diestro
9	Diestro	Metaestro/diestro	Diestro
10	Diestro	Diestro	Diestro
11	Diestro	Diestro	Diestro
12	Diestro	Diestro	

Tabla 3. Ciclo estral. Tabla que muestra la fase del ciclo estral en la cual se encontraban las ratas de los diferentes grupos experimentales en el momento de la eutanasia.

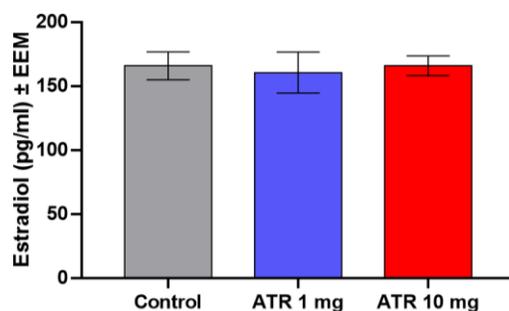


Figura 33. Niveles de estradiol en sangre. La gráfica muestra el promedio y el error estándar de los niveles de estradiol en sangre en el momento de la eutanasia de los sujetos control, los expuestos a 1 mg de ATR/kg de peso (ATR 1 mg) y los expuestos a 10 mg de ATR/kg de peso (ATR 10 mg).

Al evaluar la concentración de DA y DOPAC en las diferentes estructuras cerebrales que integran al sistema dopaminérgico no encontramos diferencias significativas en el estriado (DA, $F_{(2, 29)} = 1.478$, $p = 0.2448$; DOPAC, $F_{(2, 29)} = 0.2312$, $p = 0.7951$; HVA, $F_{(2, 29)} = 1.489$, $p = 0.2424$; DOPAC/DA, $F_{(2, 29)} = 0.5233$, $p = 0.5980$), el NAc (DA, $F_{(2, 28)} = 0.5854$, $p = 0.5636$; DOPAC, $F_{(2, 28)} = 0.04109$, $p = 0.9598$; HVA, $F_{(2, 28)} = 0.04221$, $p = 0.9587$; DOPAC/DA, $F_{(2, 28)} = 0.1924$, $p = 0.8260$), el mesencéfalo ventral (DA, $F_{(2, 32)} = 1.872$, $p = 0.1703$; DOPAC, $F_{(2, 32)} = 0.2483$, $p = 0.7816$; DOPAC/DA, $F_{(2, 32)} = 2.481$, $p = 0.0996$), la corteza prefrontal (DA, $F_{(2, 28)} = 1.629$, $p = 0.2141$; HVA, $F_{(2, 28)} = 2.751$, $p = 0.0811$) y el bulbo olfatorio (DA, $F_{(2, 30)} = 0.249$, $p = 0.7805$; HVA, $F_{(2, 28)} = 0.1134$, $p = 0.8932$) entre los diferentes grupos experimentales (Tabla 4).

Estriado	DA	DOPAC	HVA	DA/DOPAC
Control	220.9 ± 23.9	10.4 ± 1.4	12.5 ± 1.7	0.04 ± 0.005
ATR 1 mg/kg de peso	285.5 ± 29.1	12.8 ± 3.9	15.9 ± 3.5	0.04 ± 0.007
ATR 10 mg/kg de peso	267.4 ± 28.9	11.5 ± 1.5	18.9 ± 2.5	0.04 ± 0.009

Núcleo accumbens				
	DA	DOPAC	HVA	DA/DOPAC
Control	182.1 ± 17.5	11.5 ± 1.4	16.9 ± 2.2	0.06 ± 0.009
ATR 1 mg/kg de peso	167.7 ± 18.7	11.7 ± 1.2	16 ± 3	0.07 ± 0.006
ATR 10 mg/kg de peso	196.6 ± 20.7	12 ± 0.8	16.1 ± 2	0.06 ± 0.01

Mesencéfalo ventral				
	DA	DOPAC	HVA	DA/DOPAC
Control	2.7 ± 0.4	3.6 ± 0.5	N.D.	1.6 ± 0.2
ATR 1 mg/kg de peso	3.5 ± 0.4	3.8 ± 0.3	N.D.	1.1 ± 0.1
ATR 10 mg/kg de peso	3.8 ± 0.3	3.4 ± 0.3	N.D.	0.9 ± 0.1

Corteza prefrontal				
Control	0.5 ± 0.1	N.D.	0.7 ± 0.1	N.D.
ATR 1 mg/kg de peso	0.3 ± 0.04	N.D.	0.4 ± 0.07	N.D.
ATR 10 mg/kg de peso	0.4 ± 0.06	N.D.	0.4 ± 0.04	N.D.
Bulbo olfatorio				
Control	0.4 ± 0.03	N.D.	0.6 ± 0.1	N.D.
ATR 1 mg/kg de peso	0.4 ± 0.04	N.D.	0.7 ± 0.1	N.D.
ATR 10 mg/kg de peso	0.5 ± 0.06	N.D.	0.6 ± 0.07	N.D.

Tabla 4. Concentraciones de dopamina y sus metabolitos. La tabla muestra el promedio y el error estándar ($n = 10-12$) de las concentraciones de dopamina (DA), DOPAC y HVA en el estriado, el núcleo accumbens, mesencéfalo ventral y corteza prefrontal. N.D., no detectado.

VIII. Discusión

8.1 Actividad locomotora espontánea

Estudios previos han reportado que al exponer a ratas macho de la cepa Sprague-Dawley a la dosis de 10 mg de ATR/kg de peso se observó que solo después de 12 meses de exposición los sujetos presentaron hiperactividad a lo largo de 24 horas de registro de actividad locomotora (Bardullas *et al.*, 2011; Chávez-Pichardo *et al.*, 2020). Sin embargo, a diferencia de estos antecedentes, en nuestro estudio encontramos que al exponer a ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley a 1 o 10 mg de ATR/kg de peso ambos grupos presentaron menor actividad vertical, únicamente después del primer mes de exposición. La actividad vertical forma parte de una serie de patrones conductuales de actividad locomotora ante la exploración de ambientes novedosos junto con la actividad horizontal y la distancia total que recorren los sujetos en un lapso determinado. Se ha reportado que la exposición a ATR provoca una disminución de la actividad locomotora en diferentes modelos animales como cucarachas (Adedara *et al.*, 2021), pez cebra (Liu *et al.*, 2016) y hormigas (Ejomah *et al.*, 2020); sin embargo, en ninguno de estos estudios se evaluó un posible efecto dependiente del sexo en la actividad locomotora y se utilizaron machos y hembras indistintamente.

En roedores se ha reportado que la administración aguda de 100 mg de ATR/kg de peso por vía intraperitoneal en ratas macho Sprague-Dawley induce un estado profundo de hipoactividad y que este efecto se observa incluso dos meses después del tratamiento cuando se administra un reto farmacológico con anfetamina (Rodríguez *et al.*, 2013).

En este sentido, el presente trabajo es el primero en reportar hipoactividad producto de la exposición crónica a ATR en la actividad locomotora de ratas hembra y es importante resaltar que el tiempo en el cual se observó dicha alteración (DPN 52 ± 4) coincide con el momento en el cual se comienza a establecer el ciclo estral (50 ± 10) (Sharp y La Regina, 1998). Cabe mencionar que una vez que el ciclo estral se establece, las hembras adultas muestran una liberación cíclica de estradiol y progesterona a lo largo de 4 a 5 días. Durante el diestro y el metaestro los niveles de estradiol y progesterona son bajos. A medida que aumentan los niveles de estradiol y progesterona, las hembras entran en proestro, hasta que finalmente los niveles de hormonas ováricas alcanzan su punto máximo y luego comienzan a disminuir durante el estro (Simpson y Kelly, 2012).

Diversos estudios han mostrado que en ratas hembra la exposición a la ATR en etapas tempranas del desarrollo tiene efectos adversos asociados con el retraso de la pubertad que incluyen cambios en la liberación de la hormona luteinizante (LH) y la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), así como el retraso en la apertura vaginal (Ashby *et al.*, 2002; Laws *et al.*, 2000; Wirbisky y Freeman, 2015). Por ejemplo, se ha reportado que al exponer a ratas hembra Sprague-Dawley puberales a 100 mg ATR/kg de peso diariamente desde el DPN 21 al 45 se observó una disminución en el peso uterino a los 30 y 33 DPN junto con un retraso en el tiempo de la apertura vaginal (AV) (Ashby *et al.*, 2002). De manera similar al exponer a ratas hembra Wistar a 50, 100 o 200 mg de ATR/kg de peso diariamente desde el DPN 22 al 41 se observó un retraso de la AV además de una alteración en la ciclicidad estral durante los 15 días posteriores a la AV (del DPN 57-71) (Laws *et al.*, 2000). Con lo cual, ambos estudios demuestran que la ATR puede retrasar el inicio de la pubertad y alterar la ciclicidad estral en ratas hembra en etapas

tempranas. Lo anterior es importante mencionar ya que se ha reportado ampliamente que los sistemas dopaminérgicos y estrogénicos interactúan para influir en la función estriatal que incluyen funciones como la coordinación motora y locomoción (Yoest *et al.*, 2018).

Puntualizando esta interacción de los sistemas dopaminérgicos y estrogénicos, en estudios con hembras se han observado cambios dependientes del ciclo estral en la señalización de DA en ratones (Calipari *et al.*, 2017) y ratas (Xiao y Becker, 1994), pero no en machos intactos o castrados (Xiao y Becker, 1994), lo cual sugiere que este puede ser un mecanismo que contribuye a los cambios en la locomoción y la ansiedad a lo largo del ciclo estral en roedores y que las influencias de las hormonas gonadales sobre la liberación de DA en el cuerpo STR son específicas del sexo (Becker *et al.*, 1987; Marcondes *et al.*, 2001; Sayin *et al.*, 2014). Con base en lo anterior y considerando que en nuestro experimento la exposición a ATR se realizó desde el DPN 21, es probable que la hipoactividad observada en las ratas hembra se deba a un retraso en el establecimiento del ciclo estral producto de la exposición a la ATR durante el primer mes y que los estrógenos prevengan o mitiguen el efecto neurotóxico de la ATR en meses posteriores una vez que el ciclo estral se establece, ya que como es bien sabido, los estrógenos tiene un efecto protector contra agentes neurotóxicos (Astiz *et al.*, 2013; Torres-Rojas y Jones, 2018).

Cabe mencionar también que a diferencia de los estudios antes mencionados en donde las ratas macho presentaron hiperactividad a lo largo de las 24 horas de registro (Bardullas *et al.*, 2011; Chávez-Pichardo *et al.*, 2020), la exposición crónica a 1 o 10 mg ATR no provocó alteraciones en el ciclo sueño-vigilia de las ratas hembra ya que estas alteraciones locomotoras solo se observaron durante la fase de oscuridad del registro y los roedores al ser animales nocturnos presentan una mayor actividad promedio durante esta fase, mientras que en la fase de luz los animales se mantienen descansando y se mueven poco.

8.2 Laberinto elevado en cruz

Utilizando la prueba de laberinto elevado en cruz, Chávez-Pichardo *et al.* (2020) observaron un efecto dosis dependiente en la ansiedad de ratas macho después de

haber sido expuestas a 1 o 10 mg de ATR/kg de peso durante 12 meses. Sin embargo, nosotros encontramos que al exponer a ratas hembra a las mismas dosis y durante el mismo tiempo, no observamos diferencias en el tiempo que las hembras pasan en los brazos abiertos y los brazos cerrados del laberinto, con lo cual podemos inferir que, a diferencia de lo reportado en machos, la exposición crónica a ATR no provoca ansiedad en ratas hembra. Cabe resaltar que se ha reportado ampliamente que, en roedores, las hembras presentan un perfil menos ansioso que los machos en muchas pruebas conductuales de ansiedad, como la prueba de campo abierto (Brand y Slob, 1988) o el laberinto elevado en cruz (Johnston y File, 1991) y estas diferencias se han observado tanto en sujetos jóvenes como a los 12 meses de edad (Domonkos *et al.*, 2017; Simpson y Kelly, 2012). Además, se ha propuesto una asociación entre las conductas relacionadas con la ansiedad y la variabilidad de la producción endógena de hormonas sexuales dependientes de cada sexo (Frye *et al.*, 2000; Mercondes *et al.*, 2001).

Apoyando la idea presentada anteriormente, se ha reportado que machos castrados desde la adolescencia y evaluados 11 meses después en la prueba del laberinto elevado en cruz muestran índices de ansiedad significativamente menores que machos intactos (Domonkos *et al.*, 2017). Y en hembras, se ha reportado que cuando se encuentran en la fase de proestro y estro pasan significativamente más tiempo en los brazos abiertos en comparación con las ratas en diestro (Mora, Dussaubat y Diaz-Veliz, 1996; Marcondes *et al.*, 2001). Además, el tratamiento de hembras en diestro con estradiol eliminó la diferencia en el porcentaje de tiempo que las ratas en diestro y en proestro pasaban en los brazos abiertos (Marcondes *et al.*, 2001).

Con base en estos antecedentes y a las características hormonales intrínsecas de cada sexo es probable que, por un lado, la ATR potencie las conductas relacionadas con la ansiedad en machos que en condiciones basales presentan un perfil más ansioso que las hembras, mientras que en estas últimas las hormonas sexuales mitiguen los efectos neurotóxicos de la ATR y dichos efectos no se vean reflejados a nivel conductual. Sin embargo, valdría la pena evaluar el ciclo estral durante la

prueba de laberinto elevado en cruz para discernir si el hecho de no encontrar efectos significativos en los diferentes grupos expuestos a la ATR se deba a un posible enmascaramiento del ciclo estral en la ansiedad de las ratas hembra.

8.3 Laberinto en T (alternancia espontánea)

En el presente trabajo, encontramos que al evaluar la tendencia natural de las ratas hembra por alternar entre dos opciones después de haber sido expuestas a 1 o 10 mg de ATR/kg de peso durante 13 meses no se observaron diferencias entre grupos en el porcentaje de alternancia.

El paradigma de alternancia espontánea se ha utilizado ampliamente para evaluar la conducta obsesiva compulsiva que se caracteriza por la ejecución de acciones repetitivas e indecisiones (Yadin *et al.*, 1991; Moustgaard *et al.*, 2008).

Se ha reportado que la exposición a diferentes pesticidas altera la alternancia espontánea de roedores, por ejemplo, en ratas macho Wistar se observó que al administrar 0.5 µg o 5 µg de deltametrina de forma intracerebroventricular se produjo una deficiencia en la capacidad de alternar por parte de los sujetos y estas alteraciones se correlacionaron con una reducción de células inmunorreactivas para TH en la SNpc, el AVT y el STR (Souza *et al.*, 2020). En ratones, la administración crónica de 250 o 500 mg/kg de glifosato durante 12 semanas provocó una disminución del porcentaje de alternancia que en este caso se relacionó con una significativa inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) y la inducción de estrés oxidante en el cerebro (Bali *et al.*, 2019). En este sentido, solo se sabe que en ratas macho Wistar, la administración por vía oral de 120 mg de ATR/kg de peso por 16 días provoca un aumento significativo de diferentes especies reactivas de oxígeno (Abarikwu, 2014), sin embargo, hasta la fecha no se ha evaluado el estrés oxidante en el cerebro después de la administración crónica de ATR en ratas hembra.

En cuanto a nuestros resultados y como se mencionará en detalle más adelante, no encontramos diferencias significativas en las concentraciones de DA y sus metabolitos DOPAC y HVA en el STR de las ratas hembra expuestas de forma crónica a 1 o 10 mg de ATR/kg de peso, por lo cual, es probable que las dosis

utilizadas no provocaron alteraciones en el sistema dopaminérgico o indujeron estrés oxidante que se vea reflejado a nivel conductual en la alternancia de los sujetos, o bien, que para el tiempo en el cual se hizo la evaluación hayan ocurrido mecanismos compensatorios de dichas afecciones producto de la exposición a ATR. Sin embargo, valdría la pena evaluar tanto las concentraciones de DA y sus metabolitos como la generación de especies reactivas de oxígeno en etapas tempranas de exposición.

Cabe mencionar, que esta evaluación se realizó durante 5 días consecutivos en 10 ensayos por día y se observó que conforme aumentó el número de días, aumentó el número de errores. Es probable que esto se deba al estado motivado por la privación de alimento al momento de la prueba y a un proceso de aprendizaje por parte de los sujetos, ya que, conforme aumentó el número de ensayos las ratas optaron por no alternar, tal vez aprendiendo que en ambos brazos obtendrían el mismo resultado, lo cual indica una conducta perseverante en la respuesta por parte de los sujetos y se relaciona con la disminución significativa en el tiempo de llegada al reforzador a lo largo de los 5 días de prueba.

8.4 Laberinto en T (alternancia forzada)

Al forzar la elección y evaluar el porcentaje de alternancia a lo largo de 5 días de entrenamiento encontramos que la exposición crónica a 1 o 10 mg de ATR/kg de peso no afectó al desempeño de las ratas hembra durante el entrenamiento y que con base al criterio de aprendizaje propuesto del 80 al 90% de índice de alternancia (Lalonde, 2002), podemos decir que los animales de los diferentes grupos experimentales aprendieron la tarea para el tercer día de entrenamiento.

Se ha propuesto que, en la tarea de alternancia forzada, el buen desempeño del sujeto exige el uso de la memoria de trabajo, dependiente del hipocampo (McHugh y Bannerman, 2010) y de la memoria egocéntrica, dependiente del STR (Burgess, 2006). Se ha reportado que al exponer a ratas Sprague-Dawley de ambos sexos del DPN 3 al 20 a 0.5 o 1 mg de deltametrina/kg de peso se afectó la memoria egocéntrica solo de los machos en etapa adulta (Pitzer *et al.*, 2019), sin embargo,

no existen trabajos donde se haya evaluado el efecto de diversos pesticidas en la adquisición y desempeño de la tarea de alternancia forzada, específicamente.

Por otro lado, si se ha reportado que en ratas las lesiones citotóxicas en estructuras cerebrales como el núcleo talámico anterior (Aggleton *et al.*, 1995; 1996) y el fornix causan deficiencias en la alternancia espontánea de los sujetos (Shaw y Aggleton, 1993). Resultados similares se observaron al lesionar unilateralmente el núcleo anterior talámico y el hipocampo en ambos hemisferios, sugiriendo que ambas estructuras son componentes críticos para la generación de este tipo de memoria (Henry *et al.*, 2004).

Cabe mencionar que Bardullas *et al.* (2011) también realizaron esta tarea, pero en ratas macho Sprague-Dawley después de 12 meses de exposición a 10 mg de ATR y tampoco encontraron diferencias en el número de errores cometidos por los sujetos a lo largo de 5 días de entrenamiento con respecto a su grupo control. Con base en lo anterior, podemos suponer que, al igual que como se reportó previamente en ratas macho, en ratas hembra la exposición crónica a 1 o 10 mg de ATR/kg de peso no compromete la integridad y participación de las estructuras cerebrales que se sabe son necesarias para el desempeño y adquisición de la tarea de alternancia forzada.

8.5 Laberinto radial (gana y cambia)

Previamente, al evaluar el aprendizaje espacial de ratas macho mediante la tarea de laberinto radial Bardullas *et al.* (2011) no reportaron diferencias en el número de errores cometidos por los sujetos control y los expuestos a 10 mg de ATR/kg de peso a lo largo de 5 días de evaluación. En nuestro caso observamos que, de manera similar, a lo largo de 5 días consecutivos de prueba ni el grupo expuesto a 1 mg ni el expuesto a 10 mg de ATR/kg de peso mostraron diferencias significativas en el número de errores cometidos con respecto al grupo control, sugiriendo que, al igual que en ratas macho, la exposición crónica a 1 o 10 mg de ATR/kg no afecta la memoria espacial de las ratas hembra.

Diversos trabajos han reportado deficiencias producto de la exposición a pesticidas en diferentes paradigmas de aprendizaje espacial en roedores (Chen *et al.*, 2012; Shamsi *et al.*, 2021; López-Granero *et al.*, 2016; Terry *et al.*, 2012). En cuanto a la ATR, se ha reportado que en ratas macho Sprague-Dawley la exposición a 10 o 100 mg de ATR/kg de peso durante 30 días resultó en afecciones en el aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris y un decremento en los receptores a DA D1, alteraciones en la estructura del citoplasma, el aparato de golgi y las mitocondrias de las células del hipocampo (Li *et al.*, 2018; 2019).

En este sentido, se ha observado que en condiciones basales los machos se desempeñan mejor que las hembras en las pruebas espaciales como el laberinto radial, y este mejor desempeño se asocia con una mayor potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo (Monfort *et al.*, 2015). Sin embargo, se ha demostrado que la neuroinflamación en el hipocampo afecta la LTP y el aprendizaje espacial (Monfort *et al.*, 2007) y bastantes estudios *in vitro* y conductuales muestran astrogliosis, activación de microglía y aumento de citocinas proinflamatorias inducidas por pesticidas en esta región (Gómez-Giménez *et al.*, 2017; Sandström *et al.*, 2014; Wilks y Tsatsakis, 2014).

Además, se ha observado que en condiciones normales las hembras presentan mayores niveles de factores proinflamatorios como la interleucina 1-b (IL-1b) en el hipocampo a diferencia de los machos y se ha propuesto que los pesticidas que tienen efectos neurotóxicos y proinflamatorios en el hipocampo de los sujetos no afectan el aprendizaje espacial en las hembras porque las ratas hembra normales ya muestran cierto grado de neuroinflamación en el hipocampo que afecta el aprendizaje espacial en condiciones basales y que el aumento adicional de interleucinas proinflamatorias como la IL-1b inducido por los plaguicidas no empeora más el rendimiento en las pruebas espaciales (Gómez-Giménez *et al.*, 2017).

Recientemente se descubrió que la ATR induce daños proinflamatorios, apoptosis y envejecimiento celular en el hipocampo (Genovese *et al.*, 2021), y nuestros datos parecen apoyar la propuesta de que las hembras son menos susceptibles a los

efectos proinflamatorios producto de la exposición a diversos pesticidas que se ven reflejados a nivel conductual como un bajo desempeño de tareas espaciales. Sin embargo, valdría la pena evaluar tanto la expresión de citocinas proinflamatorias, así como posibles daños o alteraciones en la estructura celular de esta región para corroborar dicha hipótesis.

Cabe mencionar también, que Bardullas *et al.* (2011) si encontraron un decremento en el número de errores cometidos tanto por los machos del grupo control como los expuestos a 10 mg de ATR a lo largo de los 5 días de prueba, sin embargo, el déficit basal en el desempeño de tareas espaciales podría explicar por qué en nuestro trabajo no encontramos una disminución significativa en el número de errores cometidos por las ratas hembra de los diferentes grupos experimentales a lo largo de los 5 días de evaluación, y sugiere que, para evaluar la memoria espacial en ratas hembra, es necesario un protocolo con un entrenamiento más prolongado.

8.6 Laberinto radial (gana y cambia con retardo)

Al evaluar los efectos de la exposición crónica a 1 o 10 mg de ATR/kg en el desempeño de la versión gana y cambia con retardo del laberinto radial no encontramos diferencias significativas con respecto al grupo control en el número de errores cometidos por los sujetos a lo largo de 5 días de entrenamiento lo que sugiere que la ATR crónica no provoca deficiencias en el desempeño de esta tarea en ratas hembra.

La tarea de laberinto radial con retardo se ha recomendado para evaluar los procesos de codificación, retención y recuperación de la memoria de trabajo y se ha reportado que la corteza prelímbica (Taylor *et al.*, 2003) y el hipocampo ventral (Floresco, Seamans y Phillips, 1997), pero no el dorsal (Layfield *et al.*, 2020) son estructuras cerebrales necesarias para la adquisición de esta tarea.

Por otro lado, también se ha reportado que la neurotransmisión dopaminérgica en el NAc es crucial para el comportamiento de búsqueda de alimento cuando hay ambigüedad sobre la ubicación de la recompensa en un entorno espacial, pero no es necesaria para un comportamiento de búsqueda de alimento eficiente cuando el

animal tiene información previa sobre la ubicación de los estímulos de recompensa (Floresco *et al.*, 1997).

En cuanto a los efectos de diversos pesticidas en el desempeño de la tarea de gana y cambia con retardo, solo Terry *et al.* (2012) reportaron que al administrar a ratas macho Wistar de forma subcutánea 10 o 18 mg de clorpirifos/kg de peso durante 30 días los sujetos presentaron deficiencias en el desempeño de dicha tarea.

Nuestros resultados sugieren que la ATR no provoca alteraciones en estructuras cerebrales que se sabe participan en el desempeño de esta tarea, sin embargo, al igual que la versión de laberinto radial gana y cambia, el déficit basal en el desempeño de esta tarea podría explicar porque no encontramos una disminución significativa en el número de errores cometidos por las ratas de los diferentes grupos experimentales a lo largo de los 5 días de entrenamiento.

8.7 Coordinación motora fina

Al evaluar la coordinación motora fina mediante la prueba de la barra de equilibrio Chávez-Pichardo *et al.* (2020) no observaron diferencias significativas en el número de errores o el tiempo que le tomó a las ratas macho recorrer la barra después de haber sido expuestas a 1 o 10 mg de ATR por 14 meses. De manera similar, encontramos que en ratas hembra la exposición a 1 o 10 mg de ATR/kg de peso durante 14 meses no provocó diferencias en el número de errores o el tiempo que le toma a los sujetos de los diferentes grupos experimentales recorrer la barra.

Se ha reportado que la administración de 100 mg ATR/kg de peso desde la etapa gestacional hasta los 6 meses de edad provocó un aumento en el número de errores cometidos por los sujetos en la barra de equilibrio (Walters *et al.*, 2015). Con base a este antecedente, es probable que la ausencia de alteraciones en la coordinación motora fina reportada en ratas macho por Chávez-Pichardo *et al.* (2020) y en hembras en el presente trabajo se deba a que para el tiempo en el cual llevamos a cabo la evaluación (14 meses de edad) ocurrieron eventos compensatorios de los efectos neurodegenerativos causados por la ATR en las vías dopaminérgicas (Kuter *et al.*, 2020) o bien, que una dosis de 10 mg/kg de peso no sea suficiente para

generar dichas afecciones. Sin embargo, no podemos descartar que en hembras la ATR cause las mismas alteraciones reportadas en ratas macho por Walters *et al.* (2015) y que dichas alteraciones pudieran ser evidentes si se evalúa la coordinación motora fina en etapas más tempranas de exposición.

8.8 Coordinación motora gruesa

En cuanto a la coordinación motora gruesa evaluada mediante la prueba de cilindro giratorio Bardullas *et al.* (2011; 2013), reportaron que ratas macho Sprague-Dawley expuestas a 10 mg de ATR/kg de peso durante 10 meses presentaron menores latencias de caída con respecto al grupo control, sin embargo, en ratas hembra expuestas a 1 ó 10 mg de ATR/kg de peso durante 14 meses no encontramos diferencias significativas en el tiempo que tardaron en caer del cilindro giratorio con respecto al grupo control. Al evaluar el efecto de otros pesticidas en la coordinación motora gruesa de roedores se reportó que en ratas macho la administración de 12.5 o 25 mg/kg de peso del insecticida Beta-ciflutrina diariamente por 30 días provocó una disminución en la latencia de caída del cilindro giratorio y dichas alteraciones se correlacionaron con un decremento en las concentraciones de DA y DOPAC en regiones cerebrales como la CPF, el STR y el hipocampo (Syed *et al.*, 2015) y resultados similares se observaron después de la administración de 4 mg/kg de peso de paraquat por una semana en ratas Wistar (Ali Mirshekar *et al.*, 2020). Por otro lado, estudios en ratones han reportado que la administración de 250 o 500 mg/kg de glifosato desde la etapa gestacional hasta el día postnatal 21 provocó un decremento en la latencia de caída del rodillo giratorio en ambos sexos (Ait-Bali *et al.*, 2020). Mientras que ratas Wistar expuestas a los insecticidas endosulfán, cipermetrina y clorpirifos desde el día gestacional 7 al día postnatal 21 se observó una disminución en las latencias de caída en ratas hembra, pero no en machos (Gómez-Giménez *et al.*, 2018). Es probable que estas discrepancias en los resultados se deban a diversos factores experimentales como el tiempo en el cual se realizó la evaluación, el modelo experimental, la cepa, el sexo de los sujetos o el tiempo de tratamiento. Sin embargo, cabe mencionar que se ha reportado que las ratas hembra tienden a mostrar un mejor control en la coordinación y mejor desempeño que los machos en la prueba del cilindro giratorio (Gómez-Giménez *et*

al., 2017) ya que en condiciones basales tienden a durar más tiempo sobre el rodillo en movimiento.

Probablemente, las características neurofisiológicas y neuroanatómicas producto de la influencia de las hormonas sexuales femeninas hagan a las hembras tener un mejor desempeño en esta tarea y ser menos susceptibles a agentes neurotóxicos como la ATR que, como reportó Bardullas *et al.*, (2011, 2013), si afecta la coordinación motora gruesa de machos después de 10 meses de exposición.

8.9 Habitación/discriminación olfativa

Si bien no se observaron diferencias significativas en el tiempo que los animales olfatearon los distintos olores, si se observaron diferencias en los procesos de habituación y discriminación olfativa de los sujetos a lo largo de la prueba, lo que sugiere alteraciones en la capacidad olfatoria.

En la prueba de habituación olfativa se observó que tanto las ratas control como las expuestas a 10 mg de ATR/de peso mostraron una habituación normal tanto a los olores sociales como a los no sociales, sin embargo, las expuestas a 1 mg de ATR/kg de peso mostraron deficiencias en la habituación al olor a vainilla y al olor de otras hembras sugiriendo que la exposición crónica a 1 mg de ATR por 14 meses provoca un déficit en la identificación y familiarización con olores no sociales y sociales.

Por otro lado, al evaluar al proceso de discriminación se observó que el grupo control solo logró discernir entre los olores de macho y hembra, pero no entre el olor de vainilla y plátano; los sujetos expuestos a 1 mg de ATR/kg de peso solo lograron diferenciar el olor a macho con respecto a los olores no sociales y los expuestos a 10 mg de ATR/kg de peso solo pudieron identificar como un olor nuevo el olor a plátano y a macho.

Es probable que el hecho de que los sujetos control no hayan identificado el olor de vainilla y plátano como dos olores distintos se deba a que, al momento de estandarizar la tarea presentando 4 olores distintos, los sujetos que se utilizaron se mantuvieron en condiciones de alimentación *ad libitum*, mientras que nuestras ratas

experimentales estaban bajo restricción de alimento. Sin embargo, en cuanto a los grupos expuestos a 1 mg o 10 mg de ATR/kg de peso, nuevamente los resultados sugieren que la exposición a ambas dosis de ATR provocan una deficiencia en la percepción de olores novedosos.

Los déficits en la detección de olores (el umbral o la percepción de olores en bajas concentraciones), la identificación (la capacidad de reconocer y nombrar un olor) y la discriminación (la distinción no verbal de diferentes olores) se encuentran comúnmente en sujetos diagnosticados con EP (Tissingh *et al.*, 2001).

Se ha reportado que, en ratones, al inducir un modelo de Parkinson mediante la administración de MPTP se observó un decremento en las concentraciones de DA, en los niveles del transportador a DA y un decremento en la intensidad de inmunorreactividad a TH en el STR, además de que los sujetos mostraron dificultades en discernir entre olores de dos machos distintos (Monaghan *et al.*, 2010).

También se ha reportado que 7 días después de la administración de 1-metil-4-fenilpiridinio y de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en la SN (que provoca la muerte de las neuronas DA) se observó que los sujetos mostraron deficiencias en diferentes tareas con componentes olfativos y dichos déficits se relacionaron con una hiperactividad anormal de las células mitrales en el BO y una disminución de las respuestas beta excitatorias evocadas por el olor y las respuestas gamma altas inhibitoras en la misma región (Zhang *et al.*, 2018) lo cual sugiere un papel fundamental de la DA en el BO para la regulación y el correcto procesamiento de la señal olfativa hacia regiones superiores.

Además, recientemente, se describió que al inyectar 6-OHDA en el BO, se observó un decremento en el número de neuronas dopaminérgicas en la SN y que la ablación de las proyecciones nigrales condujo a una alteración de la percepción olfativa, con lo cual se demostró la existencia directa de proyecciones dopaminérgicas de la SN al bulbo olfatorio (Hoglinger *et al.*, 2015). En este sentido, las neuronas inmunorreactivas a la TH, dentro de la capa glomerular del BO,

parecen ser los actores clave en la discriminación del olor, contribuyendo potencialmente a la hiposmia/anosmia descrita en la EP (Rodrigues *et al.*, 2018).

Existen pocos trabajos donde se haya evaluado el efecto de la exposición a pesticidas en el sistema olfatorio de roedores. Por ejemplo, Voronkov *et al.* (2017) describieron que al administrar de forma intranasal 2.5 mg de rotenona/kg de peso durante 2 semanas se observó un decremento en las neuronas dopaminérgicas TH-ir en el BO y Genovese *et al.* (2021), evaluaron en ratones los efectos conductuales de 25 mg de ATR administrada de manera intranasal durante 28 días, sin embargo, no evaluaron los posibles efectos de este tratamiento en la anatomía del BO o en estructuras que integran las vías dopaminérgicas como el AVT o la SN.

En el BO, las CSAC co-expresan DA y GABA y la liberación sináptica de ambos neurotransmisores en las CEE que transmiten señales sensoriales a las neuronas de salida mitrales/empenachadas e impulsan la inhibición intraglomerular regula la codificación de la información que saldrá de la capa glomerular hacia las redes olfativas posteriores (Liu *et al.*, 2013).

Con base en nuestros resultados, es probable que la exposición a ATR, que se sabe ampliamente es un herbicida que afecta el sistema dopaminérgico de roedores, tenga efectos sobre las proyecciones dopaminérgicas de la SN al BO, alterando la población y dinámica de las CSAC, afectando el procesamiento de la información y provocando las deficiencias observadas en la discriminación olfativa de los grupos expuestos a 1 o 10 mg de ATR a lo largo de la tarea.

Además, recientemente se reportó que la ATR inhibe la proliferación de células madre embrionarias humanas y de células madre neurales, a partir de lo cual es probable que la ATR afecte la neurogénesis de las células TH+ en el BO y dicha afección se ve reflejada a nivel conductual como deficiencias en la discriminación olfativa de los sujetos (Shan *et al.*, 2021).

8.10 Concentraciones cerebrales de monoaminas

Bardullas *et al.* (2011; 2013) reportaron que la exposición crónica a 10 mg de ATR/kg de peso por vía oral durante un año provocó un decremento en las

concentraciones de DA y sus metabolitos en el STR. Sin embargo, en dicho trabajo se utilizaron ratas macho como modelo experimental, por lo que los efectos del mismo tratamiento en ratas hembra habían sido desconocidos hasta ahora.

En el presente trabajo encontramos que, a diferencia de lo reportado por Bardullas *et al.* (2011; 2013), al exponer a ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley a 1 o 10 mg de ATR/kg de peso diariamente durante 14 meses no se observaron alteraciones en las concentraciones de DA, DOPAC y HVA en estructuras cerebrales que integran el sistema dopaminérgico como el STR, el NAc, el mesencéfalo ventral y la CPF. Estos resultados son congruentes con el hecho de no observar alteraciones conductuales en los diferentes paradigmas que llevamos a cabo del mes 12 al 14 de exposición y en los cuales se sabe se necesita de la participación e integridad de dichas estructuras cerebrales (Floresco *et al.*, 1997; Souza *et al.*, 2020; Syed *et al.*, 2015).

Es probable que para los 14 meses de exposición hayan ocurrido mecanismos compensatorios de los efectos neurotóxicos de la ATR y que estos mecanismos estén relacionados con el sexo de los sujetos experimentales, específicamente con las hormonas sexuales femeninas, ya que se ha reportado que la administración de estradiol aumenta rápidamente las concentraciones de DA en el NAc y el STR (Becker, 1990; Pasqualini *et al.*, 1996) a la vez que disminuye la producción de GABA (Hu *et al.*, 2006).

En este sentido, se ha propuesto que el estradiol se une a los receptores de estrógeno en la membrana de las MSN para disminuir la excitación neuronal, lo que ocasiona una menor liberación de GABA y una "desinhibición" de la señalización dopaminérgica a través de una sinapsis colateral sobre las aferencias dopaminérgicas de la SNpc o la AVT (Yoest *et al.*, 2018).

Cabe mencionar que, si bien se ha reportado que las ratas hembra presentan concentraciones extracelulares de DA más altas durante el proestro y el estro que durante el diestro (Xiao y Becker, 1994), para nuestro estudio al momento de la eutanasia la gran mayoría de las hembras se encontraban en la fase de diestro, con

lo cual podemos inferir que las concentraciones de DA medidas en las ratas no está influenciado por el ciclo estral.

Con base a lo anterior podemos concluir que la exposición crónica a 1 o 10 mg de ATR/kg de peso durante 14 meses no provocó alteraciones en las concentraciones de DA y sus metabolitos en estructuras que integran el sistema dopaminérgico, sin embargo, valdría la pena evaluar dichas concentraciones en etapas en las cuales si se observaron alteraciones conductuales.

8.11 La importancia de estudiar ambos sexos

A pesar de que cada vez hay más evidencia sobre diferencias relacionadas al sexo en la investigación con animales, todavía predominan los trabajos en los cuales se utiliza a los machos como modelo experimental (Simpson y Kelly, 2012). Este sesgo tiene su justificación en bases prácticas (los machos no presentan un ciclo estral que pueda influir en los resultados), en conceptos erróneos (las influencias sexuales son pequeñas y poco confiables) o en que si no existe diferencia entre machos y hembras en un comportamiento particular se puede asumir que los sustratos neuronales que subyacen a ese comportamiento son idénticos para ambos sexos (Cahill, 2006).

En este sentido, si bien las hormonas sexuales son cruciales para muchas diferencias entre machos y hembras, no debemos ignorar los efectos organizativos de dichas hormonas en el desarrollo cerebral, así como la creciente evidencia de mecanismos genéticos que inducen diferencias sexuales en el cerebro independientemente de la acción hormonal (McEwen y Milner, 2017).

Por otro lado, la propuesta de realizar investigaciones en ambos sexos tiene más relevancia si tomamos en cuenta los estudios farmacológicos en el campo de las enfermedades neurodegenerativas donde ciertos padecimientos que son más frecuentes en el sexo femenino se estudian principalmente en el masculino o viceversa (Buoncervello *et al.*, 2017). Y cabe mencionar que en el ámbito de la neurotoxicología, también existe una gran cantidad de evidencia de diferencias individuales dependientes de la composición genética, el ambiente y el sexo en

respuesta a metales pesados, etanol, drogas, contaminantes del aire, pesticidas y disruptores endocrinos, tanto en humanos como en roedores, por lo cual es importante reconocer que el sexo de un individuo juega un papel clave en la susceptibilidad y el tratamiento de la mayoría de los padecimientos y enfermedades (Ruszkiewicz y Aschner, 2019).

Los datos aquí presentados demuestran que, a diferencia de la hiperactividad y el decremento en los niveles de dopamina en el estriado producto de la exposición crónica a ATR reportados previamente en machos (Bardullas *et al.*, 2011, Chávez-Pichardo *et al.*, 2020), en hembras, las mismas dosis y el mismo tiempo de exposición provocó hipoactividad solo en etapas tempranas de exposición sin verse afectados los niveles de dopamina en ninguna de las estructuras que integran al sistema dopaminérgico, lo cual reafirma la idea de que las diferencias sexuales en la neurotoxicidad de pesticidas, pero probablemente también de varias clases de productos químicos y contaminantes ambientales, es un tema que debe considerarse para dilucidar las influencias genéticas derivadas de cada sexo y los posibles mecanismos de acción de cada agente neurotóxico.

IX. Conclusiones

La administración crónica de 1 ó 10 mg de ATR provocó alteraciones en la actividad locomotora espontánea de ratas hembra solo después del primer mes de exposición y en el proceso de habituación y discriminación olfativa de olores no sociales y sociales a los 14 meses, pero no provocó alteraciones en la ansiedad, la memoria egocéntrica y espacial y la coordinación motora ni en las concentraciones de DA y sus metabolitos DOPAC y HVA en las regiones cerebrales que integran a los sistemas dopaminérgicos nigroestriatal, mesolímbico y mesocortical.

X. Perspectivas

Debido a que no encontramos alteraciones en la conducta ni en las concentraciones de DA y sus metabolitos en los sistemas dopaminérgicos después de 14 meses de exposición, valdría la pena hacer dicho análisis en una etapa más temprana de desarrollo, en este caso, después del primer mes donde se observó que los sujetos

expuestos tanto a 1 mg como a 10 mg de ATR/kg de peso presentaban hipoactividad en comparación con el grupo control y evaluar si dichas alteraciones se correlacionan con cambios en las concentraciones de DA en el STR como se ha reportado previamente en machos.

En cuanto a los resultados de la prueba de habituación/discriminación olfativa, valdría la pena realizar otro estudio en el cual podamos evaluar las concentraciones de DA en el bulbo después de una administración oral crónica de ATR, así como posibles daños a nivel anatómico en dicha estructura y con ello averiguar los posibles mecanismos por los cuales la ATR administrada de forma oral pueda afectar la discriminación olfativa.

XI. Referencias

Abarikwu, S. O. (2014). Protective effect of quercetin on atrazine-induced oxidative stress in the liver, kidney, brain, and heart of adult wistar rats. *Toxicology International, 21(2)*: 148–155 DOI: 10.4103/0971-6580.139794

Aggleton, J. P., Hunt, P. R., Nagle, S., & Neave, N. (1996). The effects of selective lesions within the anterior thalamic nuclei on spatial memory in the rat. *Behavioural Brain Research, 81(1-2)*: 189–198 DOI: 10.1016/s0166-4328(96)89080-2

Aggleton, J. P., Neave, N., Nagle, S., & Hunt, P. R. (1995). A comparison of the effects of anterior thalamic, mamillary body and fornix lesions on reinforced spatial alternation. *Behavioural Brain Research, 68(1)*: 91–101 DOI: 10.1016/0166-4328(94)00163-a

Ait-Bali, Y., Ba-M'hamed, S., Gambarotta, G., Sassoè-Pognetto, M., Giustetto, M., & Bennis, M. (2020). Pre- and postnatal exposure to glyphosate-based herbicide causes behavioral and cognitive impairments in adult mice: evidence of cortical and hippocampal dysfunction. *Archives of Toxicology, 94(5)*: 1703–1723 DOI: 10.1007/s00204-020-02677-7

Alavanja, M. C. R. (2009). Introduction: Pesticides use and exposure extensive worldwide. *Reviews on Environmental Health, 24(4)*: 303-309 DOI:10.1515/reveh.2009.24.4.303

Albonetti, M. E., & Farabollini, F. (1995). Effects of single restraint on the defensive behavior of male and female rats. *Physiology & Behavior*, *57*: 431–437 DOI: 10.1016/0031-9384(94)00272-7

Andersen, H. R., Debes, F., Wohlfahrt-Veje, C., Murata, K., & Grandjean, P. (2015). Occupational pesticide exposure in early pregnancy associated with sex-specific neurobehavioral deficits in the children at school age. *Neurotoxicology and Teratology*, *47*: 1-9 DOI: 10.1016/j.ntt.2014.10.006

Andersen, S. L., Rutstein, M., Benzo, J. M., Hostetter, J. C., & Teicher, M. H. (1997). Sex differences in dopamine receptor overproduction and elimination. *NeuroReport*, *8*: 1495–1498 DOI: 10.1097/00001756-199704140-00034

Ascherio, A., & Schwarzschild, M. A. (2016). The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *The Lancet Neurology*, *15*(12): 1257-1272 DOI: 10.1016/S1474-4422(16)30230-7

Ashby, J., Tinwell, H., Stevens, J., Pastoor, T., & Breckenridge, C. B. (2002). The effects of atrazine on the sexual maturation of female rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *35*: 468-473 DOI: 10.1006/rtph.2002.1571

Astiz, M., Acaz-Fonseca, E., & Garcia-Segura, L. M. (2013). Sex differences and effects of estrogenic compounds on the expression of inflammatory molecules by astrocytes exposed to the insecticide dimethoate. *Neurotoxicity Research*, *25*: 271-285 DOI: 10.1007/s12640-013-9417-0

ATSDR (2003). Reseña toxicológica de la atrazina. Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EUA.

Aungst, J. L., Heyward, P. M., Puche, A. C., Karnup, S. V., Hayar, A., Szabo, G., & Shipley, M. T. (2003). Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli. *Nature*, *426*: 623–629. DOI: 10.1038/nature02185

- Baker, H., Kawano, T., Margolis, F. L., & Joh, H. T. (1983). Transneuronal regulation of tyrosine hydroxylase expression in olfactory bulb of mouse and rat. *Journal of Neuroscience*, 3: 69–78. DOI: 10.1523/jneurosci.03-01-00069.1983
- Bali, Y. A., Kaikai, N. E., Ba-M'hamed, S., & Bennis, M. (2019). Learning and memory impairments associated to acetylcholinesterase inhibition and oxidative stress following glyphosate based-herbicide exposure in mice. *Toxicology*, 415: 18–25 DOI: 10.1016/j.tox.2019.01.010
- Bardullas, U., Giordano, M., & Rodriguez, V. M. (2013). Atrazine is primarily responsible for the toxicity of long-term exposure to a combination of atrazine and inorganic arsenic in the nigrostriatal system of the albino rat. *Neurotoxicology and Teratology*, 40: 59-66 DOI: 10.1016/j.ntt.2013.10.003
- Bardullas, U., Giordano, M., & Rodriguez, V. M. (2011). Chronic atrazine exposure causes disruption of the spontaneous locomotor activity and alters the striatal dopaminergic system of the male Sprague–Dawley rat. *Neurotoxicology*, 33: 263-272 DOI: 10.1016/j.ntt.2010.09.001
- Barr, D. B., Panuwet, P., Nguyen, J. V., Udunka, S., & Needham, L. L. (2007). Assessing exposure to atrazine and its metabolites using biomonitoring. *Environmental Health Perspectives*, 115 (10): 1474-1478 DOI: 10.1289/ehp.10141
- Bassil, K.L., Vakil, C., Sanborn, M., Cole, D. C., Kaur, J. S., & Kerr, K. J. (2007). Cancer health effects of pesticides. *Canadian Family Physician*, 53: 1704-1711
- Becker, J. B. (1990). Direct effect of 17 beta-estradiol on striatum: sex differences in dopamine release. *Synapse*, 5: 157–164. DOI: 10.1002/syn.890050211
- Becker, J. B., & Ramirez, V. D. (1981). Experimental studies on the development of sex differences in the release of dopamine from striatal tissue fragments in vitro. *Neuroendocrinology*: 32: 168–73 DOI: 10.1159/000123151
- Becker, J. B., Snyder, P. J., Miller, M. M., Westgate, S. A., & Jenuwine, M. J. (1987). The influence of estrous cycle and intrastriatal estradiol on sensorimotor

performance in the female rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 27: 53–59. DOI: 10.1016/0091-3057(87)90476-X

Becker, L. B. & Chartoff, E. (2019). Sex differences in neural mechanisms mediating reward and addiction. *Neuropsychopharmacology*, 44: 166-183 DOI: 10.1038/s41386-018-0125-6

Beyer, C., Pilgrim, C., & Reisert, I. (1991). Dopamine content and metabolism in mesencephalic and diencephalic cell cultures: sex differences and effects of sex steroids. *Journal of Neuroscience*, 11: 1325–1333 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.11-05-01325.1991

Bisenius, E. S., Veeramachaneni, D. N., Sammonds, G. E., & Tobet, S. (2006). Sex differences and the development of the rabbit brain: effects of vinclozolin. *Biology of Reproduction*, 75: 469–76 DOI: 10.1095/biolreprod.106.052795

Boffeta, P., Adami, H-O., Berry, S. C., & Mandel, J. S. (2013). Atrazine and cancer: a review of the epidemiologic evidence. *European Journal of Cancer Prevention*, 22(2): 169-180 DOI: 10.1097/CEJ.0b013e32835849ca

Borisovska, M., Bensen, A. L., Chong, G., & Westbrook, L. G. (2013). Distinct modes of dopamine and GABA release in a dual transmitter neuron. *Journal of Neuroscience*, 33: 1790–1796 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4342-12.2013

Brand, T., & Slob, A.K., (1988). Peripubertal castration of male rats, adult open field ambulation and partner preference behavior. *Behavioral Brain Research*, 30: 111–117 DOI: 10.1016/0166-4328(88)90141-6

Brzezicki, J. M., Andersen, M. E., Cranmer, B. K., & Tessari, J. D. (2003). Quantitative identification of atrazine and its chlorinated metabolites in plasma. *Journal of Analytical Toxicology*, 26: 569-573 DOI: 10.1093/jat/27.8.569

Buoncervello, M., Marconi, M., Carè, A., Piscopo, P., Malorni, W., & Matarrese, P. (2017). Preclinical models in the study of sex differences. *Clinical science (London, England: 1979)*, 131(6), 449–469 DOI: 10.1042/CS20160847

- Burgess, N. (2006). Spatial memory: how egocentric and allocentric combine. *Trends in cognitive sciences*, 10(12): 551–557 DOI: 10.1016/j.tics.2006.10.005
- Cahill, L. (2006). Why sex matters for neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, 7: 477–84 DOI:10.1038/nrn1909
- Calipari, E. S., Juarez, B., Morel, C., Walker, D. M., Cahill, M. E., Ribeiro, E., ... & Nestler, E. J. (2017). Dopaminergic dynamics underlying sex-specific cocaine reward. *Nature Communications*, 8: 13877 DOI: 10.1038/ncomms13877
- Capsoni, S., Iseppe, A., Casciano, F., & Pignatelli, A. (2021). Unraveling the role of dopaminergic and calretinin interneurons in the olfactory bulb. *Frontiers in neural circuits*, 15: 718221 DOI: 10.3389/fncir.2021.718221
- Carvalho, F.P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*, 6: 48–60
- Centonze, D., Picconi, B., Gubellini, P., Bernardi, G., & Calabresi, P. (2001). Dopaminergic control of synaptic plasticity in the dorsal striatum. *European Journal of Neuroscience*, 13: 1071-1077 DOI:10.1046/j.0953-816x.2001.01485.x
- Cerri, S., Mus, L., & Blandini, F. (2019). Parkinson's disease in women and men: What's the difference? *Journal of Parkinson's Disease*, 9: 501-515 DOI: 10.3233/JPD-191683
- Chavez-Pichardo, M. E., Reyes-Bravo, D. Y., Mendoza-Trejo, M. S., Marín-Lopez, A. G., Giordano, M., Hernández-Chan, N., Domínguez-Marchan, K., Ortega-Rosales, L. C., & Rodríguez, V. M. (2020). Brain alterations in GABA, glutamate and glutamine markers after chronic atrazine exposure in the male albino rat. *Archives of Toxicology*, 94: 3217-3230 DOI: 10.1007/s00204-020-02806-2
- Chen, N. N., Luo, D. J., Yao, X. Q., Yu, C., Wang, Y., Wang, Q., Wang, J. Z., & Liu, G. P. (2012). Pesticides induce spatial memory deficits with synaptic impairments and an imbalanced tau phosphorylation in rats. *Journal of Alzheimer's disease*, 30(3): 585–594 DOI: 10.3233/JAD-2012-111946

Chernyak, S. M., Rice, C. P., & McConnell, L. L. (1996) Evidence of currently used pesticides in air, ice, fog, seawater and surface microlayer in the Bering Sea and Chukchi Seas. *Marine Pollution Bulletin*, 32: 410–419 DOI: 10.1016/0025-326X(95)00216-A

Chevrier, C., Limon, G., Monfort, C., Rouget, F., Garlantézec, R., Petit, C., Durand, G., & Cordier, S. (2011). Urinary biomarkers of prenatal atrazine exposure and adverse birth outcomes in the PELAGIE birth cohort. *Environmental Health Perspectives*, 7(119): 1034-1041 DOI: 10.1289/ehp.1002775

Coban, A., & Filipov, N. M. (2007). Dopaminergic toxicity associated with oral exposure to the herbicide atrazine in juvenile male C57BL/6 mice. *Journal of Neurochemistry*, 100: 1177-1187 DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.04294.x

Deckel, A. W., Moran, T. H., Coyle, J. T., Sanberg, P. R., & Robinson, R. G. (1986). Anatomical predictors of behavioral recovery following fetal striatal transplants. *Brain Research*, 365: 249-258 DOI: 10.1016/0006-8993(86)91636-7

Domonkos, E., Borbélyová, V., Csongová, M., Bosy, M., Kačmárová, M., Ostatníková, D., Hodosy, J., & Celec, P. (2017). Sex differences and sex hormones in anxiety-like behavior of aging rats. *Hormones and behavior*, 93: 159–165 DOI: 10.1016/j.yhbeh.2017.05.019

Dunnett, S. B., Whishaw, I. Q., Jones, G. H., & Bunch, S. T. (1987). Behavioural, biochemical and histochemical effects of different neurotoxic amino acids injected into nucleus basalis magnocellularis of rats. *Neuroscience*, 20: 653-669 DOI: 10.1016/0306-4522(87)90117-5

Elbaz, A., Clavel, J., Rathouz, P. J., Moisan, F., Galanaud, J. P., Delemotte, B., ... & Tzourio, C. (2009). Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. *Annals of Neurology*, 66(4): 494–504 DOI: 10.1002/ana.21717

Elliott, B. M., & Grunberg, N. E. (2005). Effects of social and physical enrichment on open field activity differ in male and female Sprague-Dawley rats. *Behavioural Brain Research*, 165: 187–796 DOI: 10.1016/j.bbr.2005.06.025

Emanuele, M. A., Wezeman, F., & Emanuele, N. V. (2002). Alcohol's effects on female reproductive function. *Alcohol Research & Health, 26*: 274–81

Emanuele, M. A., Wezeman, F., & Emanuele, N. V. (1993). Diet and estrous cycle influence pain sensitivity in rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior, 45*: 255-260 DOI: 10.1016/0091-3057(93)90116-b

Fenu, S., Bassareo, V., & Di Chiara, G. (2001). A role for dopamine D1 receptors of the nucleus accumbens shell in conditioned taste aversion learning. *The Journal of Neuroscience, 21 (17)*: 6897-6904 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-17-06897.2001

Fine, L. G., & Riera, C. E. (2019). Sense of smell as the central driver of pavlovian appetite behavior in mammals. *Frontiers in Physiology, 10*: 1151 DOI: 10.3389/fphys.2019.01151

Floresco, S. B. (2014). The nucleus accumbens: An interface between cognition, emotion, and action. *The Annual Review of Psychology, 66*: 25-52 DOI: 10.1146/annurev-psych-010213-115159

Floresco, S. B., Seamans, J. K., & Phillips, A. G. (1996). A selective role for dopamine in the nucleus accumbens of the rat in random foraging but not delayed spatial win-shift-based foraging. *Behavioural Brain Research, 80(1-2)*: 161–168 DOI: 10.1016/0166-4328(96)00031-9

Floresco, S. B., Seamans, J. K., & Phillips, A. G. (1997). Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. *The Journal of Neuroscience, 17(5)*: 1880–1890 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.17-05-01880.1997

Frick, K. M., Kim, J., Tuscher, J. J., & Fortress, A. M. (2015). Sex steroid hormones matter for learning and memory: estrogenic regulation of hippocampal function in male and female rodents. *Learning and Memory, 22*: 472-493 DOI: 10.1101/lm.037267.114

Frye, C.A., Petralia, S.M., & Rhodes, M.E., (2000). Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal

progesterone and 3alpha,5alpha-THP. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 67(3), 587–596 DOI: 10.1016/s0091-3057(00)00392-0

Fuccillo, M. V. (2016). Striatal circuits as a common node for autism pathophysiology. *Frontiers in Neuroscience*, 10 (27): DOI: 10.3389/fnins.2016.00027

Garrido, T., Fraile, J., Niñerola, J. M. Figueras, M. Ginebreda, A. & Olivella, L. (2000). Survey of ground water pesticide pollution in rural areas of Catalonia (Spain). *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 78(1): 51-65

Genovese, T., Siracusa, R., Fusco, R., D'Amico, R., Impellizzeri, D., Peritore, A. F., Crupi, R., Gugliandolo, E., Morabito, R., Cuzzocrea, S., Trovato Salinaro, A., Cordaro, M., & Di Paola, R. (2021). Atrazine inhalation causes neuroinflammation, apoptosis and accelerating brain aging. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15); 7938 DOI: 10.3390/ijms22157938

Gerfen, C. R., Engber, T. M., Mahan, L. C., Susel, Z., Chase, T. N., Monsma, F. J., & Sibley, D. R. (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*, 250 (4986): 1429-1432 DOI: 10.1126/science.2147780

Gilliom, R. J., Barbash, J. E., Crawford, C. G., Hamilton, P. A., Martin, J. D., Nakagaki, N., Nowell, L. H., Scott, J. C., Stackelberg, P. E., Thelin, G. P., & Wolock, D. M. (2006) Pesticides in the nation's streams and ground water, 1992–2001: U.S. Geological Survey Circular 1291. USGS

Giusi, G., Facciolo, R. M., Canonaco, M., Alleva, E., Belloni, V., Dessi'-Fulgheri, F., & Santucci, D. (2006), The endocrine disruptor atrazine accounts for a dimorphic somatostatinergic neuronal expression pattern in mice. *Toxicological Sciences*, 89: 257-264 DOI: 10.1093/toxsci/kfj012

Glotfelty, D. E., Seiber, J. N., & Liljedahl, L. A. (1987) Pesticides in fog. *Nature*, 325: 602–605 DOI: 10.1038/325602a0

Godfrey, J. A., & Rypstra, A. L. (2019). Atrazine exposure shifts activity but has minimal effects on courtship in an agrobiont spider. *Ecotoxicology* 28: 499–506 DOI: 10.1007/s10646-019-02041-1

Gómez-Giménez, B., Felipo, V., Cabrera-Pastor, A., Agustí, A., Hernández-Rabaza, V., & Llansola, M. (2018). Developmental exposure to pesticides alters motor activity and coordination in rats. Sex differences and underlying mechanisms. *Neurotoxicity Research*, 33 (2): 247–258 DOI: 10.1007/s12640-017-9823-9

Gómez-Giménez, B., Llansola, M., Hernández-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Malaguarnera, M., Agustí, A., & Felipo, V. (2017). Sex-dependent effects of developmental exposure to different pesticides on spatial learning. The role of induced neuroinflammation in the hippocampus. *Food and Chemical Toxicology*, 99: 135–148 DOI: 10.1016/j.fct.2016.11.028

Good, N. E. (1961). Inhibitors of the Hill reaction. *Plant Physiology*, 36(6): 788-803 DOI: 10.1104/pp.36.6.788

Goodman, J., & Packard, M. G. (2017). Memory systems of the basal ganglia. In *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function* (Second edi, pp. 725-740) doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802206-1.00035-0>

Goolsby, D. A., Thurman, E. M., Pomes, M. L., Meyer, M. T., & Battaglin, W. A. (1997) Herbicides and their metabolites in rainfall: origin, transport, and deposition patterns across the Midwestern and Northeastern United States, 1990–1991. *Environmental Science Technology*, 31: 1325–1333

Groenewegen, H. J. (2003). The basal ganglia and motor control. *Neural Plasticity*, 10(1-2): 107-120 DOI: 10.1155/NP.2003.107

Grofová, I. (1975). The identification of striatal and pallidal neurons projecting to substantia nigra. An experimental study by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxide. *Brain Research*, 91(2): 268-291 DOI: 10.1016/0006-8993(75)90550-8

Halliday, G., Reyes, S., & Double, K. (2012). Substantia nigra, ventral tegmental area, and retrorubral fields. *The Human Nervous System, Third Edition*: 439-455 DOI: 10.1016/B978-0-12-374236-0.10013-6

Hansen, A. M., Treviño-Quintanilla, L. G., Márquez-Pacheco, H., Villada-Canela, M., Gonzales-Márquez, L. C., Guillén-Garcés, R. A. & Hernández-Antonio, A. (2013) Atrazina: Un herbicida polémico. *Revista Internacional de Contaminantes Ambientales*, 29: 65-84

Hayes, T.B., Hansen, M., Kapuscinski, A.R., Locke, K.A., & Barnosky, A. (2017). From silent spring to silent night: Agrochemicals and the anthropocene. *Elementa: Science of the Anthropocene*, 5: 1–24.

Henry, J., Petrides, M., St-Laurent, M., & Sziklas, V. (2004). Spatial conditional associative learning: effects of thalamo-hippocampal disconnection in rats. *Neuroreport*, 15(15): 2427–2431 DOI: 10.1097/00001756-200410250-00025

Hernandes, F., de Quadros, N., Mattos, L., Escarrone, A., Primel, E., Barros, D., & da Rosa, C. (2017). Exposure to atrazine alters behaviour and disrupts the dopaminergic system in *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 202: 94-102 DOI: 10.1016/j.cbpc.2017.08.005

Hiroi, R., & Neumaier, J. F. (2006). Differential effects of ovarian steroids on anxiety versus fear as measured by open field test and fear-potentiated startle. *Behavioural Brain Research*, 166: 93–100 DOI: 10.1016/j.bbr.2005.07.021

Höglinger, G. U., Alvarez-Fischer, D., Arias-Carrión, O., Djufri, M., Windolph, A., Keber, U., Borta, A., Ries, V., Schwarting, R. K., Scheller, D., & Oertel, W. H. (2015). A new dopaminergic nigro-olfactory projection. *Acta Neuropathologica*, 130(3), 333–348 DOI: 10.1007/s00401-015-1451-y

Hu, M., Watson, C. J., Kennedy, R. T., & Becker, J. B. (2006). Estradiol attenuates the K⁺-induced increase in extracellular GABA in rat striatum. *Synapse*, 59: 122–124. DOI: 10.1002/syn.20221

Huang, C. L., Chao, C. C., Lee, Y. C., Lu, M. K., Cheng, J. J., Yang, Y. C., & Huang, N. K. (2016). Paraquat induces cell death through impairing mitochondrial membrane permeability. *Molecular Neurobiology*, *53*(4): 2169-2188 DOI: 10.1007/s12035-015-9198-y

Hughes, R. N. (2007). Sex does matter: Comments on the prevalence of male-only investigations of drug effects on rodent behaviour. *Behavioural Pharmacology*, *18*: 583–589 DOI: 10.1097/FBP.0b013e3282eff0e8

Johnston, A. L. & File, S. E. (1991). Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiology & Behavior*, *49*: 245-250 DOI: 10.1016/0031-9384(91)90039-q

Jonasson, Z. (2005). Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *28*: 811–25 DOI: 10.1016/j.neubiorev.2004.10.006

Juárez, H., Calderón, D., Hernández, E., & Barragán, G. (2016). The role of dopamine and its dysfunction as a consequence of oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *13*: DOI: 10.1155/2016/9730467

Kelley, A. E. (2004). Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *27*: 765-776 DOI: 10.1016/j.neubiorev.2003.11.015

Kosaka, K., Toida, K., Aika, Y., Kosaka, T. (1998). How simple is the organization of the olfactory glomerulus?: the heterogeneity of so-called periglomerular cells. *Neuroscience Research*, *30*: 101–110 DOI: 10.1016/s0168-0102(98)00002-9

Kosaka, T., & Kosaka, K. (2008). Tyrosine hydroxylase-positive GABAergic juxtglomerular neurons are the main source of the interglomerular connections in the mouse main olfactory bulb. *Neuroscience Research*, *60*: 349–354. DOI: 10.1016/j.neures.2007.11.012

Kreitzer, A. C., & Malenka, R. C. (2008). Striatal Plasticity and Basal Ganglia Circuit Function. *Neuron*, *60*: 543-554 DOI: 10.1016/j.neuron.2008.11.005

Kuter, K. Z., Cenci, M. A., & Carta, A. R. (2020). The role of glia in Parkinson's disease: Emerging concepts and therapeutic applications. *Progress in Brain Research*, 252: 131–168 DOI: 10.1016/bs.pbr.2020.02.004

Lalonde R. (2002). The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26(1): 91-104 DOI:10.1016/s0149-7634(01)00041-0

Lammel, S., Hetzel, A., Hackel, O., Jones, I., Liss, B., & Roeper, J. (2008). Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron*, 57: 760-773 DOI: 10.1016/j.neuron.2008.01.022

Laws, S. C., Ferrel, J. M., Stoker, T. E., Schmid, J., & Cooper, R. L. (2000). The effects of atrazine on female Wistar rats: An evaluation of the protocol for assessing pubertal development and thyroid function. *Toxicological Sciences*, 58: 366-376 DOI: 10.1093/toxsci/58.2.366

Layfield, D., Sidell, N., Abdullahi, A., & Newman, E. L. (2020). Dorsal hippocampus not always necessary in a radial arm maze delayed win-shift task. *Hippocampus*, 30(2): 121–129 DOI: 10.1002/hipo.23141

Lazarini, F., Gabellec, M. M., Moigneu, C., de Chaumont, F., OlivoMarin, J. C., & Lledo, M. P. (2014). Adult neurogenesis restores dopaminergic neuronal loss in the olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 34: 14430–14442. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5366-13.2014

Levin, E. D., Addy, N., Nakajima, A., Christopher, N. C., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2001). Persistent behavioral consequences of neonatal chlorpyrifos exposure in rats. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 130(1): 83–89. DOI: 10.1016/s0165-3806(01)00215-2

Li, J., Li, X., Bi, H., & Li, B. (2019). The MEK/ERK/CREB signaling pathway is involved in atrazine induced hippocampal neurotoxicity in Sprague Dawley rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170: 673-681 DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.12.038

- Li, J., Li, X., Bi, H., Ma, K., & Li, B. (2018). Developmental exposure to atrazine impairs spatial memory and downregulates the hippocampal D1 dopamine receptor and cAMP-dependent signaling pathway in rats. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*: 15 DOI: 10.3390/ijms19082241
- Li, Y-S., He, X., Ma, K., Wu, Y-P., & Li, B-X. (2015). The effect of exposure to atrazine on dopaminergic development in pubertal male SD rats. *Birth Defects Research*, *104*: 184-189 DOI: 10.1002/bdrb.21151
- Lin, Z., Dodd, C. A., & Filipov, N. M. (2013). Short-term atrazine exposure causes behavioral deficits and disrupts monoaminergic systems in male C57BL/6 mice. *Neurotoxicology and Teratology*, *39*: 26-35 DOI: 10.1016/j.ntt.2013.06.002
- Liu, S., Plachez, C., Shao, Z., Puche, A., & Shipley, M. T. (2013). Olfactory bulb short axon cell release of GABA and dopamine produces a temporally biphasic inhibition-excitation response in external tufted cells. *The Journal of neuroscience*, *33*(7), 2916–2926 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3607-12.2013
- Liu, S., Puche, A. C., & Shipley, T. M. (2016). The interglomerular circuit potently inhibits olfactory bulb output neurons by both direct and indirect pathways. *Journal of Neuroscience*, *36*: 9604–9617 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1763-16.2016
- Loke, H., Harley, V., & Lee, J. (2015). Biological factors underlying sex differences in neurological disorders. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *65*: 139-150 DOI: 10.1016/j.biocel.2015.05.024
- López-Granero, C., Ruiz-Muñoz, A. M., Nieto-Escámez, F. A., Colomina, M. T., Aschner, M., & Sánchez-Santed, F. (2016). Chronic dietary chlorpyrifos causes long-term spatial memory impairment and thigmotaxic behavior. *Neurotoxicology*, *53*: 85–92 DOI: 10.1016/j.neuro.2015.12.016
- Lucion, A. B., Charchat, H., Pereira, G. A. M., & Rasia-Filho, A. A. (1996). Influence of early postnatal gonadal hormones on anxiety in adult male rats. *Physiology & Behavior*, *60*: 1419-1423 DOI: 10.1016/s0031-9384(96)00246-6

- Manning-Bog, A. B., McCormack, A. L., Li, J., Uversky, V. N., Fink, A. L., & Di Monte, D. A. (2002) The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 1641–1644 DOI: 10.1074/jbc.C100560200
- Marcondes, F. K., Miguel, K. J., Melo, L. L., & Spadari-Bratfisch, R. C. (2001). Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiology & Behavior*, 74: 435–440. DOI: 10.1016/S0031-9384(01)00593-5
- Márquez-Ramos, J. A., Hernández-Plata, I., Díaz-Muñoz, M. & Rodríguez, V. M. (2017). The hypoactivity associated with the repeated exposure to atrazine is related to decreases in the specific binding to D1-DA receptors in the striatum of rats. *Journal of Toxicology*, 9. DOI: 0.1155/2017/2169212
- Mazor, A., Matar, M. A., Kaplan, Z., Kozlovsky, N., Zohar, J., & Cohen, H. (2009). Gender-related qualitative differences in baseline and post-stress anxiety responses are not reflected in the incidence of criterion-based PTSD-like behaviour patterns. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 10: 856–869 DOI: 10.1080/15622970701561383
- McEwen, B. S., & Milner, T. A. (2017). Understanding the broad influence of sex hormones and sex differences in the brain. *Journal of Neuroscience Research*, 95: 24-39 DOI: 10.1002/jnr.23809
- Mchugh, S. B., & Bannerman, D. M. (2010). Cognition: Learning and Memory: Spatial. *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience*, Academic Press: 279-287,
- Meethal, S. V., & Atwood, C. S. (2005). The role of hypothalamic-pituitary-gonadal hormones in the normal structure and functioning of the brain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62: 257-270 DOI: 10.1007/s00018-004-4381-3
- Meffe, R., & de Bustamante, I. (2014). Emerging organic contaminants in Surface water and groundwater: A first overview of the situation in Italy. *Science of the Total Environment*, 481: 280-295 DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.02.053

- Mercondes, K.F., Miguel, J.K., Melo, L.L., & Spadar-Bratfisch, C.R. (2001). Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiology & Behavior*, *74*: 435–440 DOI: 10.1016/s0031-9384(01)00593-5
- Miller, G.T. (2004). *Sustaining the Earth*. 6 th. Ed. Pacific Grove California: Thompson Learning.
- Mingote, S., Chuhma, N., Kusnoor, S. V., Field, B., Deutch, A. Y., & Rayport, S. (2015). Functional connectome analysis of dopamine neuron glutamatergic connections in forebrain regions. *The Journal of Neuroscience*, *35*(49): 16259-16271 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1674-15.2015
- Monaghan, M. M., Leddy, L., Sung, M. L., Albinson, K., Kubek, K., Pangalos, M. N., Reinhart, P. H., Zaleska, M. M., & Comery, T. A. (2010). Social odor recognition: a novel behavioral model for cognitive dysfunction in Parkinson's disease. *Neurodegenerative diseases*, *7*(1-3), 153–159 DOI: 10.1159/000289227
- Monfort, P., Erceg, S., Piedrafita, B., Llansola, M., & Felipo, V. (2007). Chronic liver failure in rats impairs glutamatergic synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampus and learning ability. *The European Journal of Neuroscience*, *25*(7): 2103–2111 DOI: 10.1111/j.1460-9568.2007.05444.x
- Monfort, P., Gomez-Gimenez, B., Llansola, M., & Felipo, V. (2015). Gender differences in spatial learning, synaptic activity, and long-term potentiation in the hippocampus in rats: molecular mechanisms. *ACS Chemical Neuroscience*, *6*(8): 1420–1427 DOI: 10.1021/acscchemneuro.5b00096
- Mora, S., Dussaubat, N., & Diaz-Veliz, G. (1996). Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology*, *21*: 609–620 DOI: 10.1016/s0306-4530(96)00015-7
- Morales, M., & Margolis, E. B. (2017). Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, *18*: 73-85 DOI: 10.1038/nrn.2016.165

Morales, M., & Pickel, V. M. (2011). Insights to drug addiction derived from ultrastructural views of the mesocorticolimbic system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1248: 71-88 DOI: 10.1111/j.1749-6632.2011.06299.

Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2017). Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Archives of Toxicology*, 91: 549-599 DOI: 10.1007/s00204-016-1849-x

Moustgaard, A., Hau, J., & Lind, N. M. (2008). Effects of dopamine D4 receptor antagonist on spontaneous alternation in rats. *Behavioral and Brain Functions*, 4: 49 DOI: 10.1186/1744-9081-4-49

Nagayama, S., Homma, R., & Imamura, F. (2014). Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Frontiers in Neural Circuits*, 8: 98 DOI: 10.3389/fncir.2014.00098

Nandipati, S., & Litvan, I. (2016). Environmental exposures and Parkinson's disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13: 19 DOI: 10.3390/ijerph13090881

Ochoa-Acuña, H., Frankenberger, J., Hahn, L., & Carbajo, C. (2011). Drinking-water herbicide exposure in Indiana and prevalence of small-for-gestational-age and preterm delivery. *Environmental Health Perspectives*, 117(10): 1619-1624 DOI: 10.1289/ehp.0900784

Olguín, H., Guzmán, D., García, E., & Mejía, G. (2015). The role of dopamine and its dysfunction as a consequence of oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 13. DOI: 10.1155/2016/9730467

Organización Mundial de la Salud y Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2017). Manual sobre la elaboración y uso de las especificaciones de plaguicidas de la FAO y la OMS. Especificaciones de plaguicidas. Tercera revisión de la primera edición. Roma.

Orr, G. (1987) A summary of the disposition, kinetics and metabolism of atrazine in the rat. Ciba-Geigy Corp., Greensboro, NC. Study No. ABR-87116

- Padilla, E., Barrett, D., Shumake, J., & Gonzalez-Lima, F. (2009). Strain, sex, and open-field behavior: factors underlying the genetic susceptibility to helplessness. *Behavioural Brain Research*, *201*: 257–264 DOI: 10.1016/j.bbr.2009.02.019
- Park, Y-S., Sammartino, F., Young, N. A., Corrigan, J., Krishna, V., & Rezai, A. R. (2019). Anatomic review of the ventral capsule/ventral striatum and the nucleus accumbens to guide target selection for deep brain stimulation for obsessive-compulsive disorder. *World Neurosurgery*, *126*: 1-10 DOI: 10.1016/j.wneu.2019.01.254
- Pasqualini, C., Olivier, V., Guibert, B., Frain, O., & Leviel, V. (1996). Rapid stimulation of striatal dopamine synthesis by estradiol. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *16*: 411–415 DOI: 10.1007/BF02088105
- Pickel, V. M., Towle, A. C., Joh, T. H., & Chan, J. (1998). Gamma-aminobutyric acid in the medial rat nucleus accumbens: Ultrastructural localization in neurons receiving monosynaptic input from catecholaminergic afferents. *The Journal of Comparative Neurobiology*, *272*: 1-14 DOI: 10.1002/cne.902720102
- Pitzer, E. M., Sugimoto, C., Gudelsky, G. A., Huff Adams, C. L., Williams, M. T., & Vorhees, C. V. (2019). Deltamethrin exposure daily from postnatal day 3-20 in Sprague-Dawley rats causes long-term cognitive and behavioral deficits. *Toxicological Sciences*, *169*(2): 511–523 DOI: 10.1093/toxsci/kfz067
- Pryce, C. R., Lehmann, J., & Feldon, J. (1999). Effect of sex on fear conditioning is similar for context and discrete CS in Wistar, Lewis and Fischer rat strains. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, *64*: 753–759 DOI: 10.1016/s0091-3057(99)00147-1
- Rebecca, A. N., Aggarwal, N. T., Barnes, L. L., Gallagher, A., Goldstein, J. M., Kantarci, K., Mallampalli, M. P., Mormino, E. C., Scott, L., Yu, W. H., Maki, P. M., & Mielke, M. M. (2018). Understanding the impact of sex and gender in Alzheimer's disease: A call to action. *Alzheimer's & Dementia Journal*, *14* (9): 1171-1183 DOI: 10.1016/j.jalz.2018.04.008

Rodriguez, V. M., Limón-Pacheco, J. H., Mendoza-Trejo, M. S., González-Gallardo, A., Hernández-Plata, I., & Giordano, M. (2013). Repeated exposure to the herbicide atrazine alters locomotor activity and the nigrostriatal dopaminergic system of the albino rat. *Neurotoxicology*, *34*: 82-94 DOI: 10.1016/j.neuro.2012.10.012

Rodriguez, V. M., Mendoza-Trejo, M. S., Hernandez-Plata, I., & Giordano, M. (2017). Behavioral effects and Neuroanatomical targets of acute atrazine exposure in the male Sprague-Dawley rat. *Neurotoxicology*, *58*: 161-170 DOI: 10.1016/j.neuro.2016.12.006

Rodrigues, L. S., Nosedá, A., Targa, A., Aurich, M. F., & Lima, M. (2019). Olfaction in female Wistar rats is influenced by dopaminergic periglomerular neurons after nigral and bulbar lesions. *Behavioural Pharmacology*, *30*(4), 343–350 DOI: 10.1097/FBP.0000000000000443

Ross, M. K., & Filipov, N. M. (2006). Determination of atrazine and its metabolites in mouse urine and plasma by LC-MS analysis. *Analytical Biochemistry*, *351*: 161-173 DOI:10.1016/j.ab.2006.01.050

Ross, M. K., Jones, T. L., & Filipov, N. M. (2009). Disposition of the herbicide 2-chloro-4-(ethylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazine (atrazine) and its major metabolites in mice: A liquid chromatography (mass spectrometry analysis of urine, plasma, and tissue levels. *Drug Metabolism and Disposition*, *37*: 776-786 DOI: 10.1124/dmd.108.024927

Ruszkiewicz, J. A., & Aschner, M. (2019). Editorial: Sex and Gene-Dependent Neurotoxicity. *Frontiers in genetics*, *10*, 165 DOI: 10.3389/fgene.2019.00165

Sanborn, M., Kerr, K. J., Sanin, L. H., Cole, D. C., Bassil, K. L., & Vakil, C. (2007). Non-cancer health effects of pesticides: systematic review and implications for family doctors. *Canadian Family Physician*, *53*: 1712-1720

Sanda, A. K., Nantia, A. E., Manfo, T. F. P., Toboh, R. T., Abende, R. E., Adaibum, S., Moundipa, P. F., & Kamtchouing, P. (2022). Subchronic administration of

Parastar insecticide induced behavioral changes and impaired motor coordination in male Wistar rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 45: 426-4 DOI: 10.1080/01480545.2019.1709491

Sandström von Tobel, J., Zoia, D., Althaus, J., Antinori, P., Mermoud, J., Pak, H. S., Scherl, A., & Monnet-Tschudi, F. (2014). Immediate and delayed effects of subchronic Paraquat exposure during an early differentiation stage in 3D-rat brain cell cultures. *Toxicology Letters*, 230(2): 188–197 DOI: 10.1016/j.toxlet.2014.02.001

Sayin, A., Derinöz, O., Yüksel, N., Sahin, S., & Bolay, H. (2014). The effects of the estrus cycle and citalopram on anxiety-like behaviors and c-fos expression in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 124: 180–187 DOI: 10.1016/j.pbb.2014.06.002

Shamsi, M., Soodi, M., Shahbazi, S., & Omid, A. (2021). Effect of Acetamiprid on spatial memory and hippocampal glutamatergic system. *Environmental Science and Pollution Research International*, 28(22): 27933–27941 DOI: 10.1007/s11356-020-12314-6

Shan, W., Hu, W., Wen, Y., Ding, X., Ma, X., Yan, W., & Xia, Y. (2021). Evaluation of atrazine neurodevelopment toxicity in vitro-application of hESC-based neural differentiation model. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 103, 149–158 DOI: 10.1016/j.reprotox.2021.06.009

Sharp, P. E., & La Regina, M. C. (1998). The laboratory rat. A volume in The Laboratory Animal Pocket Reference Series. CRC Press LLC.

Shaw, C., & Aggleton, J. P. (1993). The effects of fornix and medial prefrontal lesions on delayed non-matching-to-sample by rats. *Behavioural Brain Research*, 54(1): 91–102 DOI: 10.1016/0166-4328(93)90051-q

Shipley, M. T., and Ennis, M. (1996). Functional organization of olfactory system. *Journal of Neurobiology*, 30: 123–176. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4695(199605)30:13.0.CO;2-N

Šimić, B., Kniewald, J., & Kniewald, Z. (1994). Effects of atrazine on reproductive performance in the rat. *Journal of Applied Toxicology*, 14(6): 401–404 DOI: 10.1002/jat.2550140603

Simpson, J., & Kelly, J. P. (2012). An investigation of whether there are sex differences in certain behavioural and neurochemical parameters in the rat. *Behavioural Brain Research*, 229: 289-300 DOI: 10.1016/j.bbr.2011.12.036

Smith, Y., & Masilamoni, J. G. (2010). Substantia nigra. Encyclopedia of movement disorders.

Soares, C. N., & Zitek, B. (2007). Reproductive hormone sensitivity and risk for depression across the female life cycle: A continuum of vulnerability? *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 33 (4): 331-343

Soldin, O. P., & Mattison, D. R. (2009). Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clinical Pharmacokinetics*, 48 (3): 143-147 DOI: 10.2165/00003088-200948030-00001

Song, X-Y., Li, J-N., Wu, Y-P., Zhang, B., & Li, B-X. (2015). Atrazine causes autophagy and apoptosis-related neurodegenerative effects in dopaminergic neurons in the rat nigrostriatal dopaminergic system. *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 13490-13506 DOI: 10.3390/ijms160613490

Souza, M. F., Medeiros, K., Lins, L., Bispo, J., Gois, A. M., Freire, M., Marchioro, M., & Santos, J. R. (2020). Intracerebroventricular injection of deltamethrin increases locomotion activity and causes spatial working memory and dopaminergic pathway impairment in rats. *Brain Research Bulletin*, 154: 1–8 DOI: 10.1016/j.brainresbull.2019.10.002

Spanò, L., Tyler, C. R., van Aerle, R., Devos, P., Mandiki, S. N., Silvestre, F., Thomé, J. P., & Kestemont, P. (2004). Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aquatic Toxicology*, 66(4): 369-379 DOI: 10.1016/j.aquatox.2003.10.009

Spinella, M. (2002). A relationship between smell identification and empathy. *The International Journal of Neuroscience*, 112: 605–612. DOI: 10.1080/00207450290025680

Stoof, J. C., & Keibian, J. W. (1984). Two dopamine receptors: biochemistry, physiology and pharmacology. *Life Sciences*, 35: 2281–2296 DOI: 10.1016/0024-3205(84)90519-8

Stradtman, S.C., & Freeman, J.L. (2021). Mechanisms of neurotoxicity associated with exposure to the herbicide atrazine. *Toxics*, 9: 207 DOI: 10.3390/toxics9090207

Stuber, G. D., Hnasko, T. S., Britt, J. P., Edwards, R. H., & Bonci, A. (2010). Dopaminergic terminals in the nucleus accumbens but not the dorsal striatum corelease glutamate. *The Journal of Neuroscience*, 30(24): DOI: 8229-8233 :10.1523/JNEUROSCI.1754-10.2010

Syed, F., Chandravanshi, L. P., Khanna, V. K., & Soni, I. (2015). Beta-cyfluthrin induced neurobehavioral impairments in adult rats. *Chemico-Biological Interactions*, 243: 19-28 DOI: 10.1016/j.cbi.2015.11.015

Taylor, C. L., Latimer, M. P., & Winn, P. (2003). Impaired delayed spatial win-shift behaviour on the eight arm radial maze following excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex in the rat. *Behavioural Brain Research*, 147(1-2): 107–114 DOI: 10.1016/s0166-4328(03)00139-6

Teicher, M. H., Krenzel, E., Thompson, A.P., & Andersen, S. L. (2003). Dopamine receptor pruning during the peripubertal period is not attenuated by NMDA receptor antagonism in rat. *Neuroscience Letters*, 339:169–171 DOI: 10.1016/s0304-3940(02)01475-1

Terry, A. V., Jr, Beck, W. D., Warner, S., Vandenhuerk, L., & Callahan, P. M. (2012). Chronic impairments in spatial learning and memory in rats previously exposed to chlorpyrifos or diisopropylfluorophosphate. *Neurotoxicology and Teratology*, 34(1): 1–8 DOI: 10.1016/j.ntt.2011.08.015

- Tissingh, G., Berendse, H. W., Bergmans, P., Dewaard, R., Drukarch, B., Stoof, J. C., & Wolters, E. C. (2001). Loss of olfaction in de novo and treated Parkinson's disease: possible implications for early diagnosis. *Movement Disorders Journal*, 16: 41–46. DOI: 10.1002/1531-8257(200101)16:13.0.co;2-m
- Torres-Rojas, C., & Jones, B. C. (2018). Sex differences in neurotoxicogenetics. *Frontiers in Genetics*, 9 (196). DOI: 10.3389/fgene.2018.00196
- Tritsch, N. X., & Saatini, B. L. (2012). Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron*, 4: 33-50 DOI: 0.1016/j.neuron.2012.09.023
- Tudi, M., Daniel Ruan, H., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C., & Phung, D. T. (2021). Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(3): 1112 DOI: 10.3390/ijerph18031112
- Van Leeuwen, J. A., Waltner-Toews, D., Abernathy, T., Smit, B., & Shoukri, M. (1999). Associations between stomach cancer incidence and drinking water contamination with atrazine and nitrate in Ontario (Canada) agroecosystems, 1987-1991. *International Journal of Epidemiology*, 28: 836-40 DOI: 10.1093/ije/28.5.836
- Vinggaard, A. M., Christiansen, S., Laier, P., Poulsen, M.E., Breinholt, V., Jarfelt, K., Jacobsen, H., Dalgaard, M., Nellemann, C., & Hass, U. (2005). Perinatal exposure to the fungicide prochloraz feminizes the male rat offspring. *Toxicological Sciences*; 85: 886–897 DOI: 10.1093/toxsci/kfi150
- Voorn, P., Vanderschuren, L. J. M. J., Groenewegen, H. J., Robbins, T. W., & Pennartz, C. M. A. (2004). Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends in Neurosciences*, 27(8): 468-474 DOI: 10.1016/j.tins.2004.06.00
- Voronkov, D. N., Kutukova, K. A., Ivanov, M. V., & Khudoerkov, R. M. (2017). Immunomorphological changes in the olfactory bulbs of rats after intranasal administration of rotenone. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 164(2), 203–206 DOI: 10.1007/s10517-017-3958-9

Wachowiak, M., & Cohen, L. B. (1999). Presynaptic inhibition of primary olfactory afferents mediated by different mechanisms in lobster and turtle. *The Journal of Neuroscience*, *19*: 8808–8817 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.19-20-08808.1999

Walker, Q. D., Rooney, M. B., Wightman, R. M., & Kuhn, C. M. (2000). Dopamine release and uptake are greater in female than male rat striatum as measured by fast cyclic voltammetry. *Neuroscience*, *95* (4): 1061-1070 DOI: 10.1016/s0306-4522(99)00500-x

Walters, J. L., Lansdell, T. A., Lookingland, K., & Baker, L. E. (2015). The effects of gestational and chronic atrazine exposure on motor behaviors and striatal dopamine in male Sprague-Dawley rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *289*: 185-192 DOI: 10.1016/j.taap.2015.09.026

Weintraub., A. Singaravelu., & J. Bhatnagar, S. (2010). Enduring and sex-specific effects of adolescent social isolation in rats on adult stress reactivity. *Brain Research*, *1343*: 83–92 DOI: 10.1016/j.brainres.2010.04.068

Wilks, M. F., & Tsatsakis, A. M. (2014). Environmental contaminants and target organ toxicities - new insights into old problems. *Toxicology Letters*, *230*(2): 81–84 DOI: 10.1016/j.toxlet.2014.08.003

Wirbisky, S. W., & Freeman, J. L. (2015). Atrazine exposure and reproductive dysfunction through the hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis. *Toxics*, *3*: 414-450 DOI: 10.3390/toxics3040414

Wise, R. A. (2004). “Dopamine, learning and motivation”. *Nature Reviews Neuroscience*, *5* (6): 483–494 DOI: 10.1038/nrn1406

Wizemann, T. M., & Pardue, M. L. (2001) Exploring the biological contributions to human health: Does sex matter? The National Academies Press, Washington DC.

World Health Organization (2003). Atrazine in drinking-water. Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Vol.2. Health criteria and other supporting information. Geneva, 1996.

Xiao, L., & Becker, J. B. (1994). Quantitative microdialysis determination of extracellular striatal dopamine concentration in male and female rats: effects of estrous cycle and gonadectomy. *Neuroscience Letters*, *180*: 155-158 DOI: 10.1016/0304-3940(94)90510-x

Yadin, E., Friedman, E., & Bridger, W. H. (1991). Spontaneous alternation behavior: An animal model for obsessive-compulsive disorder? *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, *40*: 311-315 DOI: 10.1016/0091-3057(91)90559-k

Yamaguchi, T., Sheen, W., & Morales, M. (2007). Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *European Journal of Neuroscience*, *25*: 106-118 DOI:10.1111/j.1460-9568.2006.05263.x

Yamaguchi, T., Wang, H-L., Li, X., Ng, T.H., & Morales, M. (2011). Mesocorticolimbic glutamatergic pathway. *The Journal of Neuroscience*, *31*(23). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1598-11.2011

Yoest, K. E., Quigley, J. A., & Becker, J. B. (2018). Rapid effects of ovarian hormones in dorsal striatum and nucleus accumbens. *Hormones and Behavior*, *104*: 119–129. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2018. 04.002

Zhang, W., Sun, C., Shao, Y., Zhou, Z., Hou, Y., & Li, A. (2019). Partial depletion of dopaminergic neurons in the substantia nigra impairs olfaction and alters neural activity in the olfactory bulb. *Scientific Reports*, *9*(1): 254 DOI: 10.1038/s41598-018-36538-2